Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**“Expansão *in vitro* de células estromais mesenquimais e
caracterização do secretoma: aplicações terapêuticas e
biotecnológicas”**

AMANDA MIZUKAMI

Ribeirão Preto
2016

AMANDA MIZUKAMI

**“Expansão *in vitro* de células estromais mesenquimais e
caracterização do secretoma: aplicações terapêuticas e
biotecnológicas”**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Oncologia Clínica, Células-Tronco e
Terapia Celular para a obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Células-tronco e
Terapia Celular

Orientador (a): Prof. Dra. Kamilla Swiech
Co-orientador: Prof. Dr. Vitor Marcel Faça

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Mizukami, Amanda

Expansão *in vitro* de células estromais mesenquimais e caracterização do secretoma: aplicações terapêuticas e biotecnológicas. Ribeirão Preto, 2016.

160 p. il. 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Swiech, Kamilla.

1. Células estromais mesenquimais multipotentes (CMMs). 2. Expansão celular. 3. Biorreatores. 4. Terapia Celular. 5. Secretoma. 6. Análise de custos.

Folha de aprovação

MIZUKAMI, Amanda

Expansão *in vitro* de células estromais mesenquimais e caracterização do secretoma: aplicações terapêuticas e biotecnológicas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Células-tronco e terapia celular.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos especiais

À professora Dra. Kamilla Swiech,

por me acolher, acreditar no meu potencial e principalmente por me apoiar em qualquer ideia, projeto, desafio...é um imenso prazer e honra tê-la como orientadora. Grande cientista e pessoa espetacular!

Ao professor Dr. Vitor Marcel Faça,

por todo apoio técnico-científico, discussões nas análises proteômicas e afins.

Aos meus queridos pais e irmã,

pelo encorajamento, incentivo, educação, dedicação e luta para que eu pudesse vencer medos e conquistar tudo que eu almejasse! São meus alicerces e responsáveis por todas as minhas conquistas!

Ao meu companheiro e amado esposo André,

pelo apoio incondicional, companheirismo, amor, alegrias, momentos compartilhados com muita ternura e por ser essa pessoa excepcional que só me faz ser uma pessoa melhor.

Agradecimentos

Às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP, por viabilizarem esse estudo.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e todos os alunos e funcionários do CPD, Copa, Limpeza, Recursos Audiovisuais, Financeiro, Assessoria de Imprensa, Núcleo de Projetos e Programas, Laboratórios de pesquisa...

Ao presidente da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Dr. Dimas Tadeu Covas.

À Fernanda Teresinha Udinal pelas traduções e correções do inglês.

À Sandra Bresciane pela formatação e todas ideias referentes à parte ilustrativa do trabalho.

À Adriana Maria Teles Fuzaro pela paciência, auxílio e presteza nos assuntos relacionados às normas/regimentos, defesa.

Ao laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto: Patrícia e Camila pelas análises de citometria de fluxo realizadas.

Ao técnico de laboratório Mario Abreu por toda ajuda, paciência e eficiência em toda minha trajetória.

Ao laboratório de Terapia Celular: Sâmia, Patrícia, Aline e principalmente Maristela Delgado Orellana por todo ensinamento e por contribuir tanto com todos os assuntos relacionados às CMMs.

Ao laboratório de Proteômica do Câncer: Camila, Mariana, Aline, Vera, Andrea, Germano, Guilherme e principalmente Carolina pela ajuda nas etapas finais do trabalho me auxiliando com as análises proteômicas.

Aos amigos de laboratório: Rafael, Robson, Julia, Ângelo, Lucas Botelho, Lucas Marliere, Luciana, Letícia, Keli, João, Aline, Marcela, Luiza, Everton, Lilian pela eventual ajuda em experimentos, trocando ideias, sendo psicólogos e compartilhando momentos maravilhosos e principalmente gordices no meio da semana.

As minhas queridas amigas Cintia, Malu, Elisa, Mônica, Livia, Marina pela amizade, respeito, momentos de risadas e descontração em todos esses anos de convívio!

A todos que aqueles que, embora não nomeados, me incentivaram e me deram forças com inestimáveis apoios para concluir mais essa etapa da minha vida! O meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

RESUMO

MIZUKAMI, A. **Expansão *in vitro* de células estromais mesenquimais e caracterização do secretoma: aplicações terapêuticas e biotecnológicas.** 2016. 160 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As células estromais mesenquimais (CMMs) se tornaram de grande interesse para a terapia celular devido ao seu potencial de se diferenciar e reconstituir tecidos especializados. Mais recentemente, este interesse tem aumentado significativamente devido à descoberta de que as CMMs são capazes de secretar uma infinidade de mediadores para estimular a regeneração *in situ* de tecidos lesados. Dessa forma, CMMs podem ser consideradas tanto como um produto terapêutico em si, quanto uma biofábrica de diversas proteínas relevantes do ponto de vista terapêutico. Para atender a estas crescentes demandas, ambas as aplicações requerem o desenvolvimento de processos de expansão celular com alto rendimento, sob condições de cultivo definidas, reprodutíveis, escalonáveis, permitindo a obtenção de produtos com adequada identidade, potência, pureza, segurança e viáveis economicamente. Frente ao exposto, este trabalho teve como objetivos principais o estabelecimento de um processo de expansão de CMMs baseado em biorreatores e a caracterização do secretoma destas células visando aplicações terapêuticas. Para isto, a expansão de CMMs do cordão umbilical (MCUs) foi realizada em frascos multicamadas (MC) e nos biorreatores de leito fixo (LF), tanque agitado com microcarregadores (TA) e fibras-ocas (FO). Os resultados mostraram que a taxa de proliferação específica das células foi maior (<tempo de duplicação) no biorreator de FO ($36,8 \pm 1,7$ horas), bem como o fator de expansão ($9,8 \pm 1,0$) e a eficiência na recuperação celular (100%). Um nível similar de produção celular foi observado para o TA, MC e LF com elevado fator de expansão celular ($8,8 \pm 0,39$, $8,7 \pm 0,90$, $6,9 \pm 1,3$, respectivamente). No entanto, em termos de eficiência na recuperação celular (%), LF apresentou a menor taxa de recuperação dentre todos os sistemas (18% ($\pm 0,77$)), acompanhado pelo TA (61% ($\pm 15,7$)). As células mantiveram suas características imunofenotípicas e o potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos em todos os sistemas de cultivo avaliados. Foi também realizada a análise de custos (COG) e avaliação da viabilidade econômica para produção de CMMs visando tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) em escala comercial, utilizando os sistemas de cultivo avaliados experimentalmente sob diferentes estratégias de reembolso. Apesar dos resultados experimentais satisfatórios para o biorreator FO, o COG revelou que este sistema tem o maior custo devido aos elevados custos dos consumíveis requeridos e do custo do equipamento. O frasco MC foi considerado como a tecnologia mais rentável e robusta no cenário avaliado e o biorreator TA obteve a segunda posição. O biorreator TA foi escolhido como o mais adequado analisando de maneira conjunta os dados experimentais obtidos, a análise dos custos dos diferentes sistemas de cultivo e a escalonabilidade de cada sistema. Assim, esse biorreator foi eficientemente utilizado para o cultivo de MCUs em condições isentas de SFB e xenoantígenos, sendo possível a produção de uma grande quantidade de células, representando um passo importante no desenvolvimento de um bioprocesso em conformidade com as normas das agências regulatórias. Por fim, com a análise do secretoma das CMMs por espectrometria de massas foi possível a identificação de uma gama enorme de proteínas interessantes (aprox. 2400) envolvidas em importantes processos biológicos. O futuro monitoramento dessas proteínas em biorreatores poderá representar um método inovador e original de produção de produtos livres de células para uso na terapia celular.

Palavras chave: Células estromais mesenquimais multipotentes (CMMs), expansão celular, biorreatores, terapia celular, secretoma, análise de custos.

ABSTRACT

MIZUKAMI, A. **Expansion *in vitro* of mesenchymal stem cell and secretome characterization: therapeutic and biotechnology applications.** 2016. 160 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) have become of great interest for cell therapy because of its potential to differentiate and reconstitute specialized tissues. More recently, such interest has significantly increased due to the discovery that MSC are capable of secreting a plethora of mediators to stimulate the *in situ* regeneration of injured tissues. Thus, MSC can be considered as a therapeutic product itself and as a biofactory of various relevant therapeutic proteins. To meet these increasing demands, both applications require the development of high-yield, reproducible, scalable and cost-effective bioprocesses under defined culture conditions, obtaining products with proper identity, purity and safety. Based on these, the main goal of this work was the establishment of a MSC expansion process based on bioreactors and secretome characterization of these cells targeting therapeutic applications. The MSC expansion was performed using multi-layered flasks (ML) and fixed bed (PB), stirred tank (STR) and hollow fiber (HF) bioreactors. The results showed that the proliferation rate of the cells was higher (< doubling time) in the HF bioreactor (36.8 ± 1.7 hours), as well as the expansion fold-increase (9.8 ± 1.0) and harvesting efficiency (100%). A similar level of cell production was observed for STR, ML and PB with high fold-increase (8.8 ± 0.39 , 8.7 ± 0.90 , 6.9 ± 1.3 , respectively). However, in terms of harvesting efficiency (%), PB bioreactor presented the lowest retrieval rate across all the technologies ($18\% (\pm 0.77)$), followed by STR ($61\% (\pm 15.7)$). The cells retained their functional properties after culture in all the culture systems evaluated. This study was then extended through the use of a bioprocess economics tool for the evaluation of the economic feasibility of producing MSC-based treatment for acute graft vs. host disease (aGvHD) at commercial scale, using the culture systems experimentally evaluated under different reimbursement strategies. Despite the advantageous experimental results of HF bioreactors, the COG analysis has revealed that this is the least cost effective cell culture system to be used, due to its high consumable and equipment costs. ML flasks ranked first as the most cost effective and robust technology in this scenario and microcarrier-based technologies (STR) ranked in second position. The STR bioreactor was chosen as the most suitable for MSC expansion analyzing the experimental data, COG analysis and scalability of each culture system. Thus, STR bioreactor was efficiently tested for MSC expansion under serum and xeno-free conditions and it was possible to produce a large amount of cells. The development of a scalable microcarrier-based stirred culture system using xeno-free culture medium that suits the intrinsic features of UCM-derived MSC represents an important step towards a GMP compliant large-scale production platform for these promising cell therapy candidates. Finally, with the MSC secretome analysis by mass spectrometry it was possible to identify a wide range of interesting proteins (approx. 2400) involved in important biological processes. The future monitoring of these proteins in bioreactors may represent a novel and unique method of producing cell-free products for use in cellular therapy.

Key words: Mesenchymal stem/stromal cells (MSC), cell expansion, bioreactors, cell therapy, secretome, cost of good analysis (COG).

Lista de ilustrações

Figura 1- Evolução do mercado de células-tronco.	26
Figura 2 - Representação esquemática dos sistemas de cultivo e dos biorreatores utilizados para o cultivo de CMMs.....	29
Figura 3 - Papel de alguns fatores parácrinos liberados pelas CMMs. As proteínas secretadas podem exercer diferentes funções nas células dependendo do microambiente.	38
Figura 4 – (A) Imagem ilustrativa do biorreator FibraStage®; (B) Funcionamento do biorreator com a compressão e expansão da plataforma.....	52
Figura 5 - Imagem ilustrativa do biorreator Celligen 310.	53
Figura 6 - (A) Biorreator Quantum® expansion system (Terumo BCT, EUA); (B) Fibras dispostas dentro da carcaça cilíndrica; (C) Ilustração das células crescendo no interior das fibras ocas (corte transversal) no EIC e o fluxo de nutrientes e de metabólitos tóxicos no interior do biorreator.....	54
Figura 7 - Fluxograma esquemático simplificado de todas as etapas realizadas no processo de expansão das MCUs nos diferentes sistemas de cultivo e análise dos custos associados.	64
Figura 8 - Fluxograma esquemático simplificado de todas as etapas realizadas no processo de análise do secretoma das MCUs.	65
Figura 9 - Procedimento simplificado das principais etapas realizadas para expansão das MCUs no biorreator de fibra-oca.	70
Figura 10 - Representação esquemática do procedimento adotado nos experimentos realizados para expansão das MCUs em biorreatores.....	71
Figura 11 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs em frascos multicamadas. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.	77
Figura 12 - Concentração de células em suspensão durante a fase de adesão celular realizada no biorreator de leito fixo com inóculo inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 500 mL e meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB à 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.	78
Figura 13 – Perfil de crescimento das MCUs (A), evolução do pH (B) e fator de expansão (C) durante o cultivo no biorreator de leito fixo com inóculo inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 500 mL e meio de cultura α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, a 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais	

representam o respectivo desvio padrão. As setas TM indicam troca de 50% do meio de cultivo. 79

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das MCUs aderidas nos discos de Fibra-Cel durante os dias 3 (A e D), 5 (B e E) e 7 (C e F) de cultivo em biorreator de leito fixo com magnificação de 150x (A, B e C) e 300x (D, E e F). 80

Figura 15 - Perfil de consumo de glutamina e glicose e produção de amônia e ácido láctico durante os cultivos das MCUs em biorreator de leito fixo, com inóculo inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 500 mL e meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. (A) Glicose e Lactato e (B) Glutamina e Amônia. As setas TM indicam troca de 50% do meio de cultura. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 81

Figura 16 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em biorreator de leito fixo observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (A), 28 dias para osteócitos (B) e 14 dias para condrócitos (C)..... 83

Figura 17 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs em biorreator de leito fixo. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 83

Figura 18 - Concentração de células (cél/mL) em suspensão durante a fase de adesão celular observada nos cultivos realizados em frasco *spinner* utilizando os microcarregadores Cytodex 1 (3,0 g/L), Cytodex 3 (3,0 g/L) e Cultispher-S (2,0 g/L), inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 50 mL, meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. 84

Figura 19 - Perfil de crescimento das MCUs ao longo de 7 dias de cultivo em frasco *spinner* utilizando os microcarregadores Cytodex 1 (3,0 g/L), Cytodex 3 (3,0 g/L) e Cultispher-S (2,0 g/L), inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 50 mL, meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. 85

Figura 20 - Microscopia ótica das CMMs aderidas aos microcarregadores Cultispher S, Cytodex 1 e Cytodex 3 durante o cultivo em frascos *spinner*. Magnificação 10x. ... 87

Figura 21 - Concentração de células (cél/mL) em suspensão durante a fase de adesão celular realizada no biorreator de tanque agitado, inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 88

Figura 22 - Perfil de crescimento das MCUs (A) e fator de expansão (B) em 7 dias de cultivo no biorreator tanque agitado, com inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. ... 89

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das MCUs aderidas no microcarregador Cultispher-S durante os dias 3 (A, D e G), 5 (B, E e H) e 7 (C, F e I) de cultivo no biorreator de tanque agitado. Magnificação de 100x (A, B e C); 200x (D, E e F) e 500x (G, H e I).....	90
Figura 24 - Perfil de consumo de glutamina e glicose e produção de amônia e ácido láctico durante os cultivos das MCUs em biorreator de tanque agitado, com inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL e meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. (A) Glicose e Lactato e (B) Glutamina e Amônia. As setas TM indicam troca de 50% do meio de cultura. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.....	91
Figura 25 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em biorreator de tanque agitado observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (A), 28 dias para osteócitos (B) e 14 dias para condrócitos (C).	92
Figura 26 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs em biorreator de tanque agitado. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três doadores diferentes). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.	93
Figura 27 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de lactato; (B) Vazão no EIC e (C) Taxa de consumo de glicose e produção de lactato no experimento 1 no biorreator de fibra-oca, inóculo inicial de 60×10^6 células, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes a um experimento individual.....	94
Figura 28 - Imagem das células retidas no cartucho após o procedimento de recuperação celular no biorreator de fibra-oca.....	95
Figura 29 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de lactato, (B) vazão no EIC e (C) Taxa de consumo de glicose e produção de lactato no biorreator de fibra-oca com inóculo inicial de 21×10^6 células, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 2 cultivos (dois doadores diferentes). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.	96
Figura 30 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em biorreator de fibra-oca observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (A), 28 dias para osteócitos (B) e 14 dias para condrócitos (C).....	97
Figura 31 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs no biorreator de fibra-oca com inóculo inicial de 21×10^6 células, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 2 doadores diferentes. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.	98
Figura 32 - Expansão das MCUs nos diferentes sistemas de cultivo avaliados. (A) Densidade de células inicial e final. (B) Fator de expansão estimado em função da quantidade de células obtida no final do experimento e o número de células iniciais. MC-frascos multicamada, TA-biorreator de tanque agitado, LF-biorreator de leito fixo e FO-biorreator de fibras ocas.	99

Figura 33 – (A) Distribuição do número de doadores necessários para produzir 10 000 doses por ano e (B) Distribuição dos custos para estabelecimento de BCM e BT por dose nos diferentes sistemas de cultivos avaliados para uma demanda de 10 000 pacientes por ano. 102

Figura 34 – COG por etapa do processo. As barras de erro mostram o mínimo e máximo COG/dose total e COG / milhão de células. Os parâmetros que variaram nesta análise foram: número inicial de células por banco de células, o tempo de duplicação, taxa de recuperação celular, o peso do paciente e a taxa de falhas do lote..... 103

Figura 35 - Contribuição percentual para o COG/dose dos diversos fatores considerados (reagentes, consumíveis, depreciação, mão-de-obra, controle de qualidade e transporte) na análise de custo nos diferentes sistemas de cultivo avaliados. (A) MC, (B) TA, (C) LF e (D) FO. 106

Figura 36 - Aumento/redução na porcentagem no COG/dose necessário para atingir 85% da margem de lucro bruta nos diferentes sistemas de cultivo avaliados considerando o cenário de reembolso NICE e de outros dois produtos baseados em CMMs (TEMCEL e OsteoCel)..... 108

Figura 37 - Perfil de crescimento e viabilidade das MCUs em 6 dias de cultivo em frasco *spinner*, com inóculo inicial de 1×10^5 células/mL, microcarregador Cultispher-S (1 g/L), volume de trabalho de 80 mL e meio de cultura StemPRO® CMMs SFM, a 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 4 cultivos de MCUs (quatro diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 110

Figura 38 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de ácido láctico e (B) taxa específica de consumo de glicose/produção de lactato durante os cultivos das MCUs em frasco *spinner* com inóculo inicial de $1,0 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 80 mL, meio de cultura StemPRO® MSC SFM, a 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 4 cultivos de MCUs (quatro diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 111

Figura 39 - Perfil de crescimento e viabilidade das MCUs (A) e fator de expansão (B) em 6 dias de cultivo no biorreator tanque agitado, com inóculo inicial de $2,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio de cultura StemPRO® MSC SFM, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 112

Figura 40 – Microscopia ótica com coloração DAPI (A, B e C) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (D, E e F) (150x) das MCUs aderidas no microcarregador Cultispher-S durante o cultivo em biorreator tanque agitado em meio StemPRO® MSC SFM nos dias 1, 4 e 6. 113

Figura 41 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de ácido láctico e (B) taxa específica de consumo de glicose/produção de lactato durante os cultivos das MCUs em biorreator de tanque agitado com inóculo inicial de $2,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio de cultura StemPRO® MSC SFM, a 37°C. Os resultados

apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão..... 114

Figura 42 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs no frasco *spinner* (A) e no biorreator de tanque agitado (B). Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 e 4 doadores diferentes para o biorreator de tanque agitado e frasco *spinner*, respectivamente. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 115

Figura 43 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em frasco *spinner* e biorreator de tanque agitado observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (A), 28 dias para osteócitos (B) e 14 dias para condrócitos (C)..... 115

Figura 44 - Potencial das MCUs de inibição da proliferação de linfócitos-T *in vitro* antes (barra preta) e após (barra cinza) a expansão no biorreator de tanque agitado em condições livres de SFB. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 doadores diferentes. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 116

Figura 45 - Perfil de crescimento das MCUs (A) e fator de expansão (B) em 7 dias de cultivo no biorreator tanque agitado, com inóculo inicial de $1,2 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α - MEM suplementado com 10% de soro AB humano, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 117

Figura 46 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de ácido láctico e (B) taxa específica de consumo de glicose/produção de lactato durante os cultivos das MCUs em biorreator de tanque agitado com inóculo inicial de $1,2 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α - MEM suplementado com 10% de soro AB humano, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. . 118

Figura 47 - Perfil imunofenotípico (A), potencial das MCUs de inibição da proliferação de linfócitos-T *in vitro* (B) pré e pós-expansão no biorreator de tanque agitado em condição livre de xenoantígenos; (C) Diferenciação das MCUs pós-cultivo em frasco biorreator de tanque agitado observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (a), 28 dias para osteócitos (b) e 14 dias para condrócitos (c). Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 doadores diferentes. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. 119

Figura 48 - Eletroforese SDS-PAGE do sobrenadante dos cultivos dos três diferentes doadores (duplicata) em frascos estáticos. Ilustração dos fragmentos do gel gerados após o seccionamento de cada amostra em seis partes iguais (1-6). 121

Figura 49 - Análise do secretoma global das CMMs em relação ao componente celular através do software Funrich..... 121

Figura 50 – Representação gráfica do resultado de contagem espectral das proteínas secretadas pelas CMMs utilizando três diferentes doadores (em duplicata) analisados por espectrometria de massas. O software utilizado para essa análise foi o MeV

(*MultiExperiment Viewer*). A cor da escala ilustra a relativa expressão das proteínas indicadas de acordo com os doadores: azul denota baixa expressão e vermelho, elevada expressão..... 122

Figura 51 - Análise das proteínas secretadas pelas CMMs com elevada abundância em relação ao componente celular através do software Funrich..... 123

Figura 52 - Análise das proteínas secretadas pelas CMMs com elevada abundância em relação ao envolvimento com processos biológicos através do software Funrich. 124

Lista de tabelas

Tabela 1 - Microcarregadores comerciais disponíveis atualmente e suas principais características.....	30
Tabela 2 – Características dos cultivos de CMMs com microcarregadores em frasco <i>spinner</i> e biorreator de tanque agitado reportados na literatura.	32
Tabela 3 – Características analíticas dos estudos proteômicos de CMMs utilizando espectrometria de massas.	40
Tabela 4 - Características gerais dos microcarregadores utilizados neste trabalho.	51
Tabela 5 - Parâmetros gerais utilizados e produzidos pela ferramenta de economia do processo.	63
Tabela 6 - Parâmetros metabólicos estimados para expansão das MCUs em biorreator de leito fixo.	82
Tabela 7 - Parâmetros metabólicos estimados para expansão das MCUs em biorreator de tanque agitado.	91
Tabela 8 - Características de crescimento e recuperação celular das MCUs nos diferentes sistemas de cultivo avaliados. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores) para MC, TA e LF, e 2 cultivos (dois diferentes doadores) para FO.....	100
Tabela 9 - Características operacionais e custos dos diferentes sistemas de cultivo avaliados levadas em consideração na ferramenta econômica para análise do COG. MC-frascos multicamadas, TA-biorreator de tanque agitado com microcarregadores, LF-biorreator de leito fixo, FO-biorreator de fibras-ocas.....	104
Tabela 10 - Quantificação de proteínas pelo método de Bradford nos sobrenadantes de cultura das células MCUs (3 doadores) em frascos estáticos utilizando o meio α -MEM + 10%SFB.	120

Lista de abreviaturas e siglas

ATMP - do inglês, “*Advanced Therapy Medicinal Products*”

BCM - Banco de Células Mestre

BPM - Boas Práticas de Manufatura

BT - Banco de Trabalho

CMMs - Células Estromais Mesenquimais Multipotentes

CTH - Células-Tronco Hematopoéticas

CQ - Controle de Qualidade

COG - do inglês, “*Cost of Goods*” (Análise de Custos)

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DECH - Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro

DP - Desvio Padrão

DSP - do inglês, “*Downstream Process*”

DTT - Ditionitrito

EEC - Espaço Extracapilar

EIC - Espaço Intracapilar

FO - Biorreator de Fibras Ocas

IAA - Iodoacetamida

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplado com espectrometria de massas

LF - Biorreator de Leito Fixo

LP - Lisado Plaquetário

MC - Frascos Multicamadas

MCo - Meio Condicionado

MCUs - Células Estromais Mesenquimais derivadas do Cordão Umbilical

MEC - Matriz Extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

PBMC - do inglês, "*Peripheral Blood Mononuclear Cell*" (Células Mononucleares do Sangue Periférico)

PBS - do inglês, "*Phosphate Buffer Saline*"

SDS-PAGE - Gel de Eletroforese em Poliacrilamida

SFB - Soro Fetal Bovino

TA - Biorreator de Tanque Agitado

TD - Tempo de duplicação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Células estromais mesenquimais multipotentes (CMMs)	22
1.2 CMMs sob duas vertentes: produto e biofábrica	23
1.2.1 CMMs como produto terapêutico	23
1.2.1.1 <i>Biorreatores: necessidade para o cultivo de CMMs em escala clínica</i>	27
1.2.1.2 <i>Cultivo de CMMs em condições livres de soro fetal bovino e xenoantígenos</i>	35
1.2.2 CMMs como biofábrica	37
1.2.2.1 <i>O Secretoma das CMMs</i>	39
1.3 Análise dos custos associados ao processo de expansão celular (“Costs of goods, COG”)	43
1.4 Considerações finais	44
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Materiais utilizados	49
3.1.1 Células estromais mesenquimais multipotentes e meios de cultura	49
3.1.2 Tryple® Express	50
3.1.3 Tripsina	50
3.1.4 Discos de Fibracel	50
3.1.5 Microcarregadores	50
3.1.6 Garrafas estáticas	51
3.1.7 Frasco Spinner	52
3.1.8 Biorreator de leito fixo (FibraStage®)	52
3.1.9 Biorreator de tanque agitado (Celligen 310)	53
3.1.10 Biorreator de fibra-oca (Quantum® expansion system)	53
3.2 Métodos Analíticos	55
3.2.1 Quantificação celular	55
3.2.2 Análise de glicose, glutamina e ácido láctico	56
3.2.3 Análise de amônia	56

3.2.4	Imunofenotipagem das CMMs	56
3.2.5	Potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos.....	57
3.2.6	Ensaio de inibição da proliferação de linfócitos-T.....	58
3.2.7	Coloração das células com DAPI	58
3.2.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
3.2.9	Análise dos custos (COG) dos diferentes sistemas de cultivo para expansão das MCUs	59
3.2.9.1	<i>Estudo de caso</i>	60
3.2.9.2	<i>Descrição da ferramenta</i>	61
3.2.9.3	<i>Suposições-chave</i>	62
3.3	Procedimentos Experimentais	64
3.3.1	Expansão das MCUs em monocamada e biorreatores	65
3.3.1.1	<i>Cultivos em frascos T e multicamadas</i>	65
3.3.1.2	<i>Cultivos em frasco Spinner</i>	65
3.3.1.3	<i>Biorreator de leito fixo (FibraStage®)</i>	67
3.3.1.4	<i>Biorreator de tanque agitado (Celligen 310)</i>	68
3.3.1.5	<i>Biorreator de fibra-oca (Quantum® expansion system)</i>	69
3.3.2	Análise do secretoma das CMMs.....	71
3.3.2.1	<i>Obtenção do secretoma e fracionamento de proteínas</i>	71
3.3.2.2	<i>Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas</i>	72
3.3.2.3	<i>Processamento dos dados proteômicos e bioinformática</i>	73
4.	RESULTADOS	77
4.1	Expansão das MCUs em frascos multicamadas	77
4.2	Expansão das MCUs nos diferentes tipos de biorreatores	78
4.2.1	Biorreator de leito fixo (Fibrastage®)	78
4.2.1.1	<i>Crescimento Celular</i>	78
4.2.1.2	<i>Metabolismo celular</i>	80
4.2.1.3	<i>Recuperação celular</i>	82
4.2.1.4	<i>Propriedades biológicas pós-cultivo</i>	82

4.2.2 Biorreator de tanque agitado (Celligen 310®)	84
4.2.2.1 Seleção do microcarregador em frascos spinner	84
4.2.2.2 Biorreator de tanque agitado com microcarregador Cultispher-S	88
4.2.2.2.1 Crescimento celular	88
4.2.2.2.2 Metabolismo celular	90
4.2.2.2.3 Recuperação celular	92
4.2.2.2.4 Propriedades biológicas pós-cultivo	92
4.2.3 Biorreator de fibra-oca (Quantum® expansion system)	93
4.2.3.1 Crescimento celular	93
4.2.3.2 Recuperação celular	97
4.2.3.3 Propriedades biológicas pós-cultivo	97
4.3 Comparação dos diferentes sistemas de cultivo avaliados	98
4.3.1 Comparação da expansão celular	98
4.3.2 Comparação dos custos da expansão (COG)	100
4.3.2.2 Estudo da viabilidade econômica dos sistemas de cultivo avaliados	102
4.3.2.3 Principais fatores relacionados aos custos	104
4.3.2.4 Análises de Reembolso	106
4.4 Expansão das MCUs em condições livres de SFB e xenoantígenos em biorreator tanque agitado	109
4.4.1 Expansão das MCUs em condições livres de SFB	109
4.4.1.1 Frasco spinner	110
4.4.1.2 Biorreator de tanque agitado	111
4.4.1.3 Caracterização biológica pós-cultivo	114
4.4.2 Expansão das MCUs em condições livres de xenoantígenos	116
4.5 Análise do secretoma das CMMs	120
4.5.1 Perfil proteômico global das CMMs provenientes de cultivos estáticos	120
5. DISCUSSÃO	127
6. CONCLUSÕES	146
7. REFERÊNCIAS	149

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células estromais mesenquimais multipotentes (CMMs)

As células-tronco mesenquimais foram descritas pela primeira vez há mais de 40 anos atrás por Friedenstein e colaboradores (1976) e a partir daí diversos pesquisadores caracterizaram essas células, isoladas da medula óssea, como uma população de células aderentes, com morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciar-se *in vitro* em osso, cartilagem, gordura, tendão e músculo (Hoch e Leach, 2014). Essas células constituem uma população rara de progenitores multipotentes que contribuem para a homeostase tecidual, regeneração de tecidos mesenquimais, tais como osso, cartilaginoso, muscular, adiposo, ligamento, tendão, estroma medular, além de exercerem um papel fundamental na hematopoese (Pittenger *et al.*, 1999).

Em 2006, uma nomenclatura para as células-tronco mesenquimais foi proposta durante reunião da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT): células estromais mesenquimais multipotentes (CMMs). Esta nova nomenclatura se refere à célula com capacidade de aderência ao plástico, expressão positiva ($\geq 95\%$) de antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90 e negativa ($\leq 2\%$) de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alfa ou CD19 e HLA-DR, assim como a capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (Dominici *et al.*, 2006).

No ser humano a medula óssea é a principal fonte de CMMs, com frequência estimada em cerca de 0,001% a 0,01% (Porada e Almeida-Porada, 2010). Contudo, já foram isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como o tecido muscular esquelético e derme (Young *et al.*, 2001), tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), membrana sinovial (De Bari *et al.*, 2001), endotélio e subendotélio da veia umbilical (Covas *et al.*, 2003), rim (Almeida-Porada *et al.*, 2002) e polpa dentária (Poltavtseva *et al.*, 2014), dentre outros.

Em geral, as CMMs podem ser expandidas *in vitro* por 8-15 passagens em poucas semanas devido ao seu alto potencial proliferativo (Hoch e Leach, 2014). Porém, com o aumento do número passagens, geralmente após 30-40 duplicações, as células apresentam diminuição do crescimento celular e indução da apoptose, podendo perder a multipotencialidade e os principais

marcadores celulares específicos, o que leva a perda das suas propriedades terapêuticas (Ikebe e Suzuki, 2014).

1.2 CMMs sob duas vertentes: produto e biofábrica

As CMMs se tornaram de grande interesse para a terapia celular devido ao seu potencial de se diferenciar e reconstituir tecidos especializados. Mais recentemente, este interesse tem aumentado significativamente devido à descoberta de que as CMMs são capazes de secretar uma infinidade de mediadores para estimular a regeneração *in situ* de tecidos lesados (Faça, 2012). Portanto, devido ao fato das CMMs servirem tanto como um produto terapêutico em si, bem como uma biofábrica de diversas proteínas relevantes, houve um grande interesse em explorar estas células nas últimas décadas. A infusão de CMMs autólogas foi realizada pela primeira vez em 1995 e de forma alogênica sete anos depois (Arango-Rodriguez *et al.*, 2015). Atualmente, mais de 360 ensaios clínicos (apenas 8 no Brasil) encontram-se em andamento (estudos abertos) para avaliar a segurança e a eficácia das CMMs no tratamento de diversas doenças (www.clinicaltrials.gov).

Para atender à demanda clínica, ambas as aplicações requerem condições de cultivo e processos bem definidos e reprodutíveis, assim como as especificações de produto, identidade, potência, pureza e segurança bem estabelecidas (Rowley, 2010). Assim, no presente trabalho serão abordados os componentes envolvidos nestes processos, tanto para a obtenção CMMs como um produto celular, o que requer uma expansão controlada em um biorreator especializado, quanto para a utilização das mesmas como biofábricas, a fim de identificar proteínas importantes produzidas pela célula. As duas abordagens resultam em produtos com grande potencial para aplicação na terapia celular.

1.2.1 CMMs como produto terapêutico

O termo terapia celular descreve um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas que visam a utilização de células para tratamento de doenças

(Zago, 2007). Compreende a medicina regenerativa, os transplantes com célula-tronco hematopoéticas (CTH), a imunoterapia, a aférese, a criobiologia, a imunosseleção e a terapia gênica (Godara *et al.*, 2008).

As CMMs, devido ao seu fácil isolamento e cultivo, rápida expansão *in vitro*, potencial de diferenciação e imunossupressão, têm se tornado candidatas ideais para os protocolos da terapia celular (Kassem *et al.*, 2004) e medicina regenerativa (Bieback *et al.*, 2010). Uma vez administrada por via intravenosa, as CMMs são capazes de migrar para o tecido danificado e se diferenciar em células tecido-específicas, liberar fatores tróficos, promover a neovascularização, gerenciar o estresse oxidativo e fibrose ou desencadear uma resposta anti-inflamatória (Arango-Rodriguez *et al.*, 2015).

Diversos estudos indicam que as CMMs possuem propriedades imunomodulatórias, interagindo com células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, células natural killer (NK) e linfócitos B. Sua capacidade imunossupressora é demonstrada *in vitro* pela inibição da proliferação de linfócitos T e produção de citocinas pró-inflamatórias após estimulação celular pelas CMMs (Hoogduijn *et al.*, 2010). Assim, as CMMs estão sendo empregadas com sucesso na facilitação da reconstituição hematopoiética e imunológica após o transplante de CTH para o tratamento de doenças como: doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Ringden e Le Blanc, 2011), doença de Crohn (Ciccocioppo *et al.*, 2011), diabetes mellitus, anemia aplástica (Mabed e Shahin, 2012), dentre outras. Em 2004, Le Blanc e colaboradores pela primeira vez transplantaram CMMs haploidênticas em meninos de 9 anos de idade para tratamento da DECH grau IV. Um ano depois, o estudo demonstrou notória resposta clínica, sem nenhuma complicação observada (Le Blanc *et al.*, 2004). O tratamento da DECH representa o maior sucesso clínico da aplicação das CMMs até o momento e foi considerado um importante avanço dentro do campo da terapia celular (Zhao *et al.*, 2015).

Uma porcentagem significativa dos estudos clínicos em andamento utilizando CMMs se refere ao tratamento de doenças cardiovasculares. Estudos foram publicados mostrando que as CMMs poderiam dar origem a células que se assemelham fenotipicamente e morfológicamente a cardiomiócitos (Shim *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, diversos

estudos pré-clínicos com animais e clínicos indicaram que a injeção intracoronária de CMMs pode representar um método simples e efetivo para o tratamento de doenças cardíacas (Squillaro *et al.*, 2015). Esse fato gerou muita expectativa no campo da medicina regenerativa, sugerindo a utilização dessas células para tratamento pós-infarto do miocárdio, ou até mesmo para tratamento de doenças cardíacas crônico-progressivas, tais como a insuficiência cardíaca congestiva (Porada e Almeida-Porada, 2010). Em 2011, Friis e colaboradores foram os primeiros a avaliar a segurança e eficácia da injeção intramiocárdica de CMMs autólogas em pacientes com doença arterial coronária estável. Os resultados foram promissores, com aumento significativo da função ventricular esquerda (Friis *et al.*, 2011). Pouco tempo depois, esses resultados positivos foram confirmados por Mathiasen e colaboradores em um estudo clínico fase II em 60 pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Após 12 meses, CMMs infundidas induziram a regeneração do tecido lesado do miocárdio, confirmando a segurança do tratamento e melhora funcional de lesões no coração (Mathiasen *et al.*, 2012). Apesar de um número considerável de estudos demonstrar os efeitos terapêuticos do transplante de CMMs em doenças cardíacas, o mecanismo exato permanece pouco claro. A principal teoria é de que os efeitos potenciais resultem de efeitos parácrinos exercidos pela liberação de moléculas bioativas pelas CMMs, que por sua vez ativa as células residentes no coração a gerarem novos vasos sanguíneos e cardiomiócitos. A descoberta de células-tronco cardíacas residentes suporta tal teoria (Squillaro *et al.*, 2015).

Outra área também muito explorada para uso clínico das CMMs é a Engenharia de Tecidos, cuja promessa é a construção *in vitro* de tecidos para serem transplantados. As células injetadas são bem toleradas e bons resultados têm sido obtidos nestes estudos (Abdallah e Kassem, 2008). As possibilidades de aplicações das CMMs em defeitos ósseos são evidentes e uma série de estudos envolvendo a doença osteogênese imperfeita (Guillot *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Otsuru *et al.*, 2012; Chan e Gotherstrom, 2014) e hipofosfatasia (Tadokoro *et al.*, 2009; Katsube *et al.*, 2010) tem sido realizados. A capacidade das CMMs em se diferenciar em tendão também tem sido demonstrada. Para isso, pesquisadores utilizam materiais biocompatíveis tais

como ácido poliglicólico, ácido polilático, polipropileno e colágeno tipo I para crescimento das CMMs e posterior diferenciação em tendão (Butler *et al.*, 2010; Sahoo *et al.*, 2010; Hogan *et al.*, 2011; Garvican *et al.*, 2014; Ramdass e Koka, 2014).

Conforme mencionado anteriormente, nas últimas décadas, grande atenção e incentivos tem sido voltados para utilização de CMMs na terapia celular e medicina regenerativa. Tal fato é acompanhado pelo crescimento de empresas de terapias baseadas em células. O mercado de terapias com células-tronco foi avaliado em US\$ 2,7 bilhões em 2011, com biobanco de células-tronco e produtos auxiliares (compostos/reagentes utilizados no processo de manufatura que não estão presentes no produto final, mas impactam a segurança, potência e pureza do produto) estimados em cerca de US\$ 2,6 bilhões. Tais empresas estão avançando através de uma ampla e diversificada frente, e o mercado total deverá expandir para US\$ 8,8 bilhões de dólares até 2016 (Figura 1), o que pode ser visto como um sinal de reconhecimento da comunidade do potencial destas terapias (Syed e Evans, 2013).

Fonte: Adaptado de Syed e Evans, 2013.

Figura 1- Evolução do mercado de células-tronco.

As terapias celulares baseadas em CMMs, campo emergente que se originou principalmente nas pequenas empresas de biotecnologia, possuem um custo extremamente elevado (ex. produto TEMCEL[®] - CMMs alogênicas para tratamento da DECH, US\$ 98/10⁶ células; Osteocel[®] - tratamento alogênico de

enxerto ósseo utilizando CMMs, US\$ 12.958/10⁶ células) e o desenvolvimento de bioprocessos de produção em larga escala viáveis economicamente e compatíveis com as normas de Boas Práticas de Manufatura (BPM) é um grande desafio a ser enfrentado.

1.2.1.1 Biorreatores: necessidade para o cultivo de CMMs em escala clínica

Embora a maioria dos ensaios clínicos com células-tronco ainda esteja no início (fases I, II e III, de acordo com www.clinicaltrials.gov), os dados existentes apontam para a necessidade de elevadas doses de células para uma adequada eficácia terapêutica. Terapias utilizando CMMs envolvem a utilização de 1-100 milhões de células/kg do paciente, diferindo de acordo com a doença a ser tratada. Como exemplos, podem ser citados: esclerose múltipla, 1-2 x10⁶ células/Kg (Connick *et al.*, 2011); infarto do miocárdio, 48-60 x10⁶ células/Kg (Chen *et al.*, 2004); diabetes, 1,2-1,5 x10⁶ células/Kg (Jiang *et al.*, 2011); doença do enxerto contra o hospedeiro, 0,4-9 x10⁶ células/Kg (Le Blanc *et al.*, 2008). Além disso, a frequência estimada de CMMs nos tecidos de origem é muito baixa, tornando essencial a expansão *in vitro* destas células.

Diversos fatores podem influenciar o rendimento da expansão de CMMs e esses fatores são dependentes de doadores ou dependentes da técnica de expansão. Fatores dependentes de doadores incluem idade (Stenderup *et al.*, 2003), presença de traumas (Seebach *et al.*, 2007) e a presença de doenças sistêmicas (Peng *et al.*, 2007). Fatores dependentes da técnica se referem à utilização de sistemas de cultivo diferentes com modos de operação distintos que podem impactar no rendimento da expansão celular.

Atualmente, a maior parte dos ensaios clínicos em andamento utilizam CMMs expandidas em cultivos planares (2D, cultura em monocamada), como frascos T, conforme mostrado na Figura 2A. Frascos multicamadas (por exemplo, CellSTACKs[®], Corning; *Cell Factories*, Thermo Fisher) com 4- ou 10-andares tornaram-se o sistema de escolha nos processos de produção de CMMs em escala comercial (Van Den Bos *et al.*, 2014). Entretanto, estes sistemas 2D possuem várias limitações: a falta de homogeneidade, com geração de gradientes de concentração de nutrientes e metabólitos; a

transferência de oxigênio para o meio líquido é limitada pela pequena área de interface gás-líquido (Jing *et al.*, 2013); a falta de monitoramento e controle das condições ambientais limita a produtividade de células (Yu *et al.*, 2009) e afeta a reprodutibilidade dos cultivos. Além disso, durante a expansão em monocamada, os procedimentos são laboriosos e requerem grande habilidade dos operadores, de maneira a manter a assepsia nos cultivos. Considerando uma única indicação clínica, envolvendo um número de pacientes superior a 250.000 por ano (produção na ordem de 10^{12} a 10^{14} células), a área superficial necessária para expandir 10^{12} CMMs seria equivalente a dois campos de futebol americano, 10700 m^2 (Szczyпка *et al.*, 2014).

Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de expansão *in vitro* eficientes que permitam a obtenção de grandes quantidades de células com adequada qualidade terapêutica e com o menor custo possível. Para isso, biorreatores têm sido utilizados pelo fato de permitirem o monitoramento e controle das condições de cultivo necessárias para uma expansão eficiente e reprodutível, além de possibilitarem a realização de estudos controlados com o objetivo de entender os efeitos de parâmetros biológicos, químicos e físicos no crescimento celular (Martin *et al.*, 2004). Vários tipos de biorreatores têm sido utilizados para a expansão de CMMs e cada um tem características específicas que devem ser avaliadas a fim de selecionar o que mais atende às necessidades de cada aplicação. Biorreatores descartáveis são preferidos devido à eliminação dos passos de limpeza e de esterilização, porém tem a desvantagem de gerar maior quantidade de resíduos quando descartados e aumentar o custo do processo (Jung *et al.*, 2012).

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 2 - Representação esquemática dos sistemas de cultivo e dos biorreatores utilizados para o cultivo de CMMs.

Biorreator do tipo tanque agitado

Os biorreatores do tipo tanque agitado são muito utilizados na biotecnologia moderna. A maior parte dos produtos (proteínas recombinantes, anticorpos, enzimas) oriundos do cultivo de células animais em larga escala é produzida nesse tipo de biorreator (Wang *et al.*, 2005). Em geral, são semelhantes aos fermentadores utilizados na fermentação submersa de microrganismos, sendo de projeto simples, em forma de tanque e, normalmente, providos de impelidores para efetuar a mistura do meio de cultura, juntamente com as células em suspensão, como ilustra a Figura 2C. Os parâmetros básicos de um processo biotecnológico, como pH, temperatura e oxigênio dissolvido, são devidamente monitorados e controlados (Chico *et al.*, 2008).

O biorreator mais simples do tipo tanque agitado e com resultados muito bons em relação à expansão de CMMs é o frasco *spinner*. Os frascos *spinner* (recipiente de vidro ou plástico com um agitador magnético central e braços laterais para adição e remoção de meio e células) oferecem diversas

vantagens em relação ao sistema em monocamada, como: maior controle em cultura homogênea, simplicidade e facilidade no manuseio (Figura 2B).

Como as CMMs são células dependentes de ancoramento, sua expansão em frascos *spinner* ou em outros sistemas agitados só é possível através da utilização da tecnologia de microcarregadores. Os microcarregadores são partículas geralmente esféricas, com diâmetros da ordem de 60-400 μm , que servem como suporte para adesão e crescimento celular. Podem ser feitos de diversos materiais como celulose, dextrana, vidro, poliestireno, colágeno ou gelatina. Os microcarregadores oferecem a vantagem de fornecer uma grande área superficial para crescimento celular durante a proliferação em uma cultura em suspensão homogênea (Chen *et al.*, 2013). A Tabela 1 a seguir ilustra alguns microcarregadores disponíveis comercialmente e suas principais características.

Tabela 1 – Exemplos de alguns microcarregadores comerciais disponíveis atualmente e suas principais características.

Microcarregador	Material	Carga	Porosidade	Fabricante
Cytodex 1	Matriz de dextrana com grupo DEAE	+	Não	GE Healthcare
Cytodex 3	Matriz de dextrana coberta com colágeno	n.d.	Não	GE Healthcare
Cytoline	Polietileno/Sílica	n.d.	Sim	GE Healthcare
Cytopore	Matriz de celulose com grupo DEAE	+	Sim	GE Healthcare
Pronectin F	Poliestireno recoberto com fibronectina	n.d.	Não	SoloHill
Plastic plus	Poliestireno	+	Não	SoloHill
FACT III	Poliestireno com colágeno porcino tipo I	+	Não	SoloHill
Cultispher S	Gelatina porcina	n.d.	Sim	Sigma Aldrich
Cultispher G	Gelatina porcina (maior estabilidade térmica)	n.d.	Sim	Sigma Aldrich
GEM	Partícula magnética de alginato coberta com gelatina	n.d.	Sim	Hamilton

n.d. – não disponível

Fonte: Site GE Healthcare, SoloHill, Sigma Aldrich, Hamilton.

Diversos estudos tem relatado a utilização de frascos *spinner* com microcarregadores para expansão de células-tronco embrionárias (Fernandes *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2009; Fernandes-Platzgummer *et al.*, 2011), células-tronco pluripotentes induzidas (Badenes *et al.*, 2014), CMMs (Frauenschuhr *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Schop *et al.*, 2008; Eibes *et al.*, 2010; Schop *et al.*, 2010; Boo *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012; Caruso *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Zhao, G. *et al.*, 2015), porém, com resultados de expansão celular discrepantes. Alguns são proclamados como excelentes para expansão das células, mas não realizam a etapa de recuperação pós-cultivo dificultando sua implementação na terapia celular. A Tabela 2 apresenta alguns resultados de cultivos de CMMs em frasco *spinner* e biorreator de tanque agitado com microcarregadores reportados na literatura.

O cultivo em larga escala de CMMs humanas foi descrito primeiramente por Rafiq e colaboradores (2013) com a utilização de um biorreator de tanque agitado de 5L. Com um volume de trabalho de 2,5 L e microcarregador não-poroso de plástico P-102L (Solohill Engineering Inc., EUA), os pesquisadores conseguiram atingir uma densidade máxima de células de $1,7 \times 10^5$ células/mL em 12 dias de cultivo. Isso representou uma expansão de 6 vezes, equivalente a produção em 65 frascos T de 175 cm² confluentes (Rafiq *et al.*, 2013). Conforme mostrado na Tabela 2, outros autores também reportaram a expansão de CMMs em biorreatores do tipo tanque agitado com microcarregadores.

Novas abordagens utilizando sistemas descartáveis têm surgido com o aumento da importância dos bioprocessos envolvendo células-tronco. Assim, pesquisadores demonstraram a expansão de CMMs humanas da medula óssea utilizando um biorreator do tipo tanque agitado descartável de 3L em combinação com microcarregador de colágeno. CMMs foram expandidas durante cinco dias, atingindo um número total de $5,0 \times 10^4$ células/mL (150 milhões de células), correspondendo a um fator de expansão de 5,2 vezes. As células recuperadas foram capazes de se diferenciar em adipócitos e mostraram níveis semelhantes de expressão gênica e proteica de genes característicos de CMMs (Kehoe *et al.*, 2012).

Tabela 2 – Características dos cultivos de CMMs com microcarregadores em frasco *spinner* e biorreator de tanque agitado reportados na literatura.

	Eibes <i>et al.</i> , 2010	Boo <i>et al.</i> , 2011	Caruso <i>et al.</i> , 2014	Zhao <i>et al.</i> , 2015	Goh <i>et al.</i> , 2013	Chen <i>et al.</i> , 2014	Hupfeld <i>et al.</i> , 2014
Tipo de célula Origem Espécie	CMMs Medula óssea Humana	CMMs Medula óssea Ratos	CMMs Medula óssea Humana	CMMs Wharton's jelly Humana	CMMs Fetal Humana	CMMs Medula óssea Humana	CMMs Cordão umbilical
Sistema de cultivo	<i>spinner</i>	<i>spinner</i>	<i>spinner</i>	<i>spinner</i>	Biorreator Tanque agitado	Biorreator Tanque agitado	Biorreator Tanque agitado
Microcarregador	Cultispher-S	Cvtodex-1	Cvtodex-3	Cultispher-G	Cvtodex-3	Cvtodex-3	Cvtodex-1
Duração do experimento (dias)	12	14	7	8	12	7	13
Meio de cultura	Mesenpro +2% SFB	--	α-MEM +15% SFB	DMEM-F12 +10%SFB	DMEM +10%SFB	α-MEM +10%SFB	α-MEM +10%SFB
Concentração/ número de células inicial	5x10 ⁴ cél/mL	1,21 x 10 ⁵ cél/mL	1,25 x 10 ⁵ cél/mL	5x10 ⁶ células	2x10 ⁴ cél/mL	1x10 ⁴ cél/mL	--
Concentração/ número de células final	4,2 x 10 ⁵ cél/mL	6,24 x 10 ⁵ cél/mL	4,85 x 10 ⁵ cél/mL	13x10 ⁶ células	8,0 x 10 ⁵ cél/mL	1,5 x 10 ⁶ cél/mL	2,5 x 10 ⁵ cél/mL
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,41	--	0,86	--	--	--	--
Fator de expansão	8,4	5,1	3,9	2,6	16	16	--
Recuperação celular (%)	--	--	87,2	--	97	--	--

Em um trabalho semelhante, Jing e colaboradores (2013) testaram o uso do biorreator Mobius CellReady de 3-L para o cultivo de CMMs da medula óssea utilizando meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 12 dias, foram produzidas um total de aproximadamente $1,7 \times 10^5$ células/mL (600 milhões de células), representando um fator de expansão de 35 vezes.

Biorreator tipo Rocking motion

O biorreator descartável tipo *rocking motion* é uma opção atrativa para culturas de células de mamíferos quando bioprocessos de acordo com as boas práticas de manufatura (BPM) são requeridos. Este biorreator consiste em uma bolsa de plástico descartável alocada sobre uma plataforma cuja agitação do fluido induz a formação de ondas. Essas ondas proporcionam uma boa homogeneidade e excelente transferência de oxigênio (Figura 2D). Neste sistema de cultivo, microcarregadores também são necessários para a expansão das CMMs. Este biorreator, além de ser descartável e do bioprocessamento ocorrer em sistema fechado, tem como vantagens: risco reduzido de contaminação, escalonabilidade e flexibilidade.

Timmins e colaboradores (2012) isolaram as CMMs a partir da placenta humana e as expandiram no biorreator tipo *rocking motion* (Wave[®], GE Healthcare, EUA) utilizando dois tipos de microcarregadores. Este sistema de cultura permitiu, após sete dias de cultura, expansão de 10 vezes utilizando o microcarregador Cytodex 3 e 15 vezes em Cultispher-S. De acordo com estimativas do autor e do método de isolamento de células proposto, 500 gramas de uma placenta seriam suficientes para produzir células para infusão em dois pacientes de 70 kg com uma dose de 5×10^6 células/Kg após a primeira passagem (Timmins *et al.*, 2012).

Biorreator de fibra oca

A utilização de módulos de fibras ocas ("*hollow fiber*") para expansão de células para uso clínico foi descrita há cerca de 20 anos por Knazek e colaboradores (1990) para a expansão de linfócitos. Este biorreator é composto por dois compartimentos divididos em espaço intracapilar e extracapilar.

Normalmente, as células crescem no espaço intracapilar composto por uma série de membranas semipermeáveis na forma de capilares. O meio de cultura é adicionado na parte exterior das membranas (extracapilar) cuja permeabilidade permite a transferência de nutrientes e metabólitos provenientes do meio de cultura para as células e até mesmo a retenção de determinadas proteínas de alto peso molecular, produzidas pelas células, no espaço intracapilar (Figura 2E). Para o adequado fornecimento de oxigênio às células, o sistema geralmente conta com um sistema de aeração específico na linha de recirculação de meio de cultura (Roberts *et al.*, 2012).

Em um estudo utilizando um biorreator de fibra-oca descartável (Sistema de Expansão celular Quantum[®], Terumo BCT, EUA), Nold e colaboradores (2013) avaliaram o cultivo de CMMs partindo de aspirado de medula óssea não-processado. A cultura consistiu no crescimento de células aderidas às fibras do biorreator, sendo que a adesão celular foi facilitada pelo uso de um revestimento de fibronectina, proteína animal que é capaz de interagir com a matriz extracelular. A partir de 8-32 mL de aspirado de medula óssea foram obtidos $2-58 \times 10^6$ células em um período de 15-27 dias. O cultivo de CMMs na segunda passagem por 13 dias levou a um fator de expansão de 10-20 vezes (Nold *et al.*, 2013). Mais recentemente, Hanley e colegas (2014) também avaliaram o sistema de expansão celular Quantum[®] para expansão de CMMs de aspirado de medula óssea não-processado. Após 21 dias, obtiveram uma média de $6,6 \times 10^8$ de células a partir de 25 mL de aspirado. Os autores estimaram que a utilização do sistema Quantum envolveu 133 eventos abertos em comparação com 54.400 eventos em frascos T (Hanley *et al.*, 2014). Jones (2013) demonstrou que as CMMs expandidas nesse sistema não exibem instabilidade genética pós-cultivo (Jones *et al.*, 2013). Este sistema de expansão também está sendo testado pela empresa Athersys (EUA) para expansão das células mesenquimais MultiStem[®] em ensaios clínicos para tratamento de uma série de doenças, como doença inflamatória intestinal, doença do enxerto contra o hospedeiro e infarto agudo do miocárdio (Vaes *et al.*, 2012).

Biorreator de leito fixo

Nos biorreatores de leito fixo as células são mantidas em um leito fixo, ou seja, confinadas em um ambiente definido. O meio de cultura é circulado através do leito, transportando nutrientes e metabólitos (Chico *et al.*, 2008). Um biorreator dessa classe que pode ser utilizado na produção de células para terapia celular é o biorreator FibraStage[®] (New Brunswick Scientific, EUA) (Figura 2F). Assim como no caso do biorreator tipo *rocking motion*, o biorreator FibraStage é descartável, facilitando, portanto, a regulamentação e a garantia da qualidade do processo de expansão.

O biorreator FibraStage[®] é composto por um frasco de cultura estéril de 500 mL com 10g de discos Fibra-cel (poliestireno) e uma plataforma que comprime e expande cada frasco. Durante a compressão, meio de cultura flui para as células, fornecendo nutrientes e removendo metabólitos indesejáveis. Na expansão, o meio de cultura retorna para o fundo do frasco, permitindo uma troca de gases adequada para as células, uma vez que o leito contendo os discos de Fibra-cel fica exposto ao ambiente gasoso (New Brunswick Scientific, 2007). A empresa israelense Pluristem está utilizando com sucesso um biorreator de leito fixo (tecnologia própria e patenteada) para produção de células mesenquimais derivadas da placenta (PLacental eXpanded, PLX) para aplicações em diversas doenças (isquemia de membros inferiores, síndrome aguda da radiação, entre outras).

1.2.1.2. Cultivo de CMMs em condições livres de soro fetal bovino e xenoantígenos

As CMMs são atualmente consideradas “*Advanced Therapy Medicinal Products*” (ATMP) pela *European Medicine Agency* (EMA) e devem ser manipuladas e manufaturadas de acordo com as normas exigidas pelas agências regulatórias (Torre *et al.*, 2015). Isolamentos de rotina e procedimentos de expansão utilizam tradicionalmente soro animal (por exemplo, soro fetal bovino (SFB)), uma vez que este possui em sua composição fatores de crescimento, citocinas, hormônios que auxiliam no crescimento celular (Jochems *et al.*, 2002). Porém, a utilização de SFB traz

algumas desvantagens, pois apresenta uma elevada variabilidade lote a lote, introduz no meio de cultura altas concentrações de proteínas que podem ser alergênicas/imunogênicas e aumentam o risco de contaminação (vírus, príons, endotoxinas), comprometendo a utilização das CMMs para fins terapêuticos (Chase *et al.*, 2010; Gottipamula *et al.*, 2014; Swamynathan *et al.*, 2014). É estimado que quando são administradas em um paciente 10^8 CMMs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB, cerca de 7-30 mg de proteínas de origem bovina também são infundidas (Hemeda *et al.*, 2014), quantidade esta suficiente para induzir uma rejeição imunológica das células injetadas (Spees *et al.*, 2004). Dessa forma, quando o objetivo final é a utilização em aplicações clínicas, é importante eliminar os componentes derivados de animais, através da utilização de meios de cultura definidos e livres de soro e xenoantígenos para o isolamento e a expansão *in vitro* de CMMs humanas. Além disso, deve-se assegurar que todos os reagentes utilizados durante as etapas de isolamento e expansão (microcarregadores, enzimas de dissociação) também sejam livres de componentes animais.

Diversos estudos utilizaram meios de cultura comerciais livres de xenoantígenos para o isolamento e crescimento das CMMs em cultivos estáticos (frascos T, multicamadas) (Chase *et al.*, 2010; Hartmann *et al.*, 2010; Gottipamula *et al.*, 2013; Simoes *et al.*, 2013; Al-Saqi *et al.*, 2014; Gottipamula *et al.*, 2014; Heathman *et al.*, 2015). Todos os estudos relataram semelhanças no isolamento e proliferação celular quando comparado com meio de cultura contendo SFB. Além disso, tem-se buscado fontes proteicas de origem humana como substituto do SFB, como por exemplo, o plasma, soro autólogo ou alogênico, lisado plaquetário (LP) (Kocaoemer *et al.*, 2007; Goedecke *et al.*, 2011; Hatlapatka *et al.*, 2011; Bieback, 2013) e soro proveniente de sangue do cordão umbilical (Julavijitphong *et al.*, 2014). Estes derivados de sangue humano têm sido considerados uma alternativa mais segura e prática ao uso de SFB nos protocolos clínicos (Bieback, 2013). Isso se deve ao fato de que tais componentes do sangue humano são utilizados na prática clínica há muitos anos, oferecendo baixo potencial de risco devido à realização já bem padronizada e estabelecida de testes para garantir a segurança do produto.

O soro AB humano pode ser considerado uma alternativa promissora ao

SFB devido a sua disponibilidade e possibilidade de uso alogênico. Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a eficácia e qualidade do soro AB humano como suplemento alternativo ao SFB. Os resultados mostraram que o meio de cultura suplementado com 10% de soro AB humano foi capaz de suportar o crescimento de CMMs quando comparado com o controle (10% SFB), mantendo o perfil imunofenotípico e citogenético, assim como características funcionais pós-cultivo. Além disso, foi demonstrado que o soro AB humano produzido apresentou reprodutibilidade lote-a-lote e os parâmetros de qualidade necessários para aplicação na terapia celular (dos Santos, 2015; dos Santos *et al.*, 2016, artigo submetido).

Apesar da importância do desenvolvimento de um processo de expansão escalonável e totalmente isento de xenoantígenos, um menor número de grupos de pesquisa têm testado a combinação de microcarregadores e meios de cultura livres de xenoantígenos. Desses trabalhos, a maioria relata a utilização de CMMs derivadas de tecidos adultos (tecido adiposo e medula óssea) em frascos *spinner* (Santos *et al.*, 2011; Hervy *et al.*, 2014; Carmelo *et al.*, 2015) e biorreator de tanque agitado (Dos Santos *et al.*, 2014). Observa-se grande discrepância entre os resultados de crescimento e expansão celular, destacando-se a grande variação encontrada utilizando diferentes fontes de CMMs. Vale ressaltar que trabalhos referentes à expansão de CMMs derivadas do cordão umbilical em biorreatores utilizando meios livres de soro e xenoantígenos são inexistentes.

1.2.2 CMMs como biofábrica

Outra propriedade das CMMs que vem ganhando bastante interesse na terapia celular é o efeito autócrino/parácrino destas células sobre lesões. Estudos mostraram que as CMMs transplantadas não precisam necessariamente estar no sítio da lesão, mas sim nas imediações, secretando sinais tróficos com potencial efeito terapêutico. Esses fatores tróficos incluem uma variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas, fatores angiogênicos, fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular, hormônios (Kupcova Skalnikova, 2013), os quais são importantes sinais

celulares com profundo efeito na dinâmica do microambiente e importantes também em processos celulares como a imunidade, fibrose, apoptose, angiogênese, mitose e diferenciação (Figura 3) (Caplan e Dennis, 2006). Como exemplo, nos casos específicos de isquemia ou deterioração tecidual severa, as CMMs são atraídas ao sítio lesado onde secretam fatores bioativos que auxiliam o processo de reparo e regeneração. Neste mesmo sentido, alguns estudos recentes vêm demonstrando o sucesso da aplicação das CMMs na supressão seletiva do crescimento tumoral, devido também a esta secreção de fatores bioativos no sítio do câncer (Ciavarella *et al.*, 2011). Aplicações envolvendo a capacidade imunomodulatória das CMMs, como no combate à doença de enxerto contra o hospedeiro (DECH) e outras doenças imunológicas, vem sendo considerada como a mais importante no âmbito da terapia celular (Le Blanc *et al.*, 2008). Nesse sentido, as CMMs podem modificar a resposta imune e secretar mediadores parácrinos, reduzindo a inflamação e acelerando a regeneração dos tecidos pela ativação das células-tronco residentes e mobilização das células-tronco sistêmicas através da sinalização quimiotática (Nonnis, 2015). Desta forma, as CMMs podem também ser consideradas veículos para fornecimento *in situ* de múltiplos fatores bioativos, com a grande vantagem de serem sítio-específicas.

Fonte: Adaptado de Maumus *et al.*, 2013.

Figura 3 - Papel de alguns fatores parácrinos liberados pelas CMMs. As proteínas secretadas podem exercer diferentes funções nas células dependendo do microambiente.

1.2.2.1 O Secretoma das CMMs

O perfil proteômico vem sendo amplamente utilizado no estudo do secretoma das CMMs e permite a investigação em larga escala das proteínas secretadas, sua função e principalmente o entendimento de condições patológicas e mecanismos *in vivo* (Stastna e Van Eyk, 2012). A primeira análise proteômica de CMMs humanas da medula óssea foi publicada em 2001 (Colter *et al.*, 2001) e, desde então, diversos estudos foram publicados. A maioria destes estudos utilizam técnicas convencionais como fracionamento por cromatografia e à base de gel, com identificação de proteínas utilizando espectrometria de massas, bioinformática e *microarrays*.

Atualmente, os estudos *in vitro* do secretoma de CMMs envolvem o cultivo das células por 12-48 horas em meio de cultura contendo SFB, sendo substituído por meio livre de SFB por 24-72 horas. A presença do SFB na cultura influencia dramaticamente a separação e detecção de proteínas secretadas, pois a pequena quantidade de fatores tróficos secretados pelas células pode ser mascarada pela alta concentração de proteínas presentes no SFB. Assim, a eliminação do SFB nas análises diminui substancialmente a complexidade da amostra e aumenta a reprodutibilidade (Kupcova Skalnikova, 2013). Ao final do cultivo das células, o meio condicionado (MCo) é coletado, centrifugado e filtrado para remoção de resíduos celulares. O volume do MCo pode ser reduzido com a concentração das amostras em concentrador tipo Speed-vac[®]. Como mencionado anteriormente, diversas técnicas podem ser utilizadas para identificação de proteínas, porém será dado enfoque na espectrometria de massas, pois foi a técnica utilizada no presente trabalho.

O secretoma presente no MCo das amostras biológicas consiste em um elevado número de diferentes proteínas com diversas complexidades e dessa forma, é necessário utilizar métodos de separação para fracionar e reduzir a complexidade, aumentando a cobertura proteômica e melhorando a identificação de proteínas por espectrometria de massas (Stastna e Van Eyk, 2012). O método mais comum envolve a utilização de gel de eletroforese 2D, em que as proteínas são separadas no gel pelo ponto isoelétrico e massa molar. Assim, os spots de interesse são cortados no gel, reduzidos, alquilados,

enzimaticamente digeridos em peptídeos e processados pelo espectrômetro de massas. A espectrometria de massas determina a massa molecular exata dos peptídeos permitindo a identificação da proteína por comparação com dados obtidos em um banco de dados específico (Kupcova Skalnikova, 2013). Exemplos de trabalhos descrevendo o secretoma das CMMs de diversas fontes utilizando a ferramenta de espectrometria de massas encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Características analíticas dos estudos proteômicos de CMMs utilizando espectrometria de massas.

Fonte/organismo	Condicionamento	Tipo de amostra	Técnica analítica	Referência
Medula óssea/Ratos	42h	MCo livre de soro	LC-MS/MS	(Estrada <i>et al.</i> , 2009)
Medula óssea/Humano	24h	Microvesículas isoladas em meio livre de soro	1D SDS PAGE + LC-MS/MS	(Kim <i>et al.</i> , 2012)
Tecido adiposo/Humano	48-114h	MCo livre de soro	SILAC + 1D SDS PAGE + LC-MS/MS	(Alvarez-Llamas <i>et al.</i> , 2007)
Tecido adiposo /Ratos	48h	MCo livre de soro	2D LC-MS/MS	(Chen <i>et al.</i> , 2005)

*MCo=meio condicionado; LC-MS/MS=Cromatografia líquida acoplado com espectrometria de massas; SDS-PAGE=gel de eletroforese em poliacrilamida; SILAC=*stable isotope labeling*.

Interessante observar que muitos estudos tem focado na indução da diferenciação das CMMs em condrócitos, adipócitos e osteócitos com posterior análise das proteínas envolvidas durante esse processo. Moléculas como SMOC (Isoforma 1 de *SPARC-related modular calcium-binding protein 1 precursor*), MMP-1 (*Interstitial collagenase precursor*), SPARC (*Osteonectin*), EFEMP1 (*EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1*), PXDN (*Peroxidasin homologue*), TIMP (*Metalloproteinase inhibitor precursor*), DCD (*Dermcidin precursor*) durante a osteogênese (Choi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013); Serpinas, PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*), ENO1 (α -enolase), Laminin B2, MMP-2 (*Matrix metalloproteinase 2*), PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor type 1*) na adipogênese (Zvonic *et al.*, 2007; Chiellini *et al.*, 2008); e durante a condrogênese, CRAC1 (*Cartilage acidic protein 1*), COMP (*Cartilage oligomeric matrix protein*), TIMP-1, Versican,

PRG4 (*Proteoglycan 4*), MGP (*Matrix gla protein*) (Arufe *et al.*, 2011; De La Fuente *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2014) foram descritas. Choi e colaboradores (2010) examinaram o perfil de proteínas secretadas durante o processo de diferenciação em osteócitos em CMMs da medula óssea e foram capazes de identificar 208 e 202 proteínas com baixo e elevado potencial osteogênico, respectivamente (Choi *et al.*, 2010). Tais estudos envolvendo a detecção e identificação de proteínas exclusivas secretadas pelas CMMs envolvidas nos processos de diferenciação podem ser utilizados para melhorar e aumentar o potencial de diferenciação linhagem-específica.

Além disso, determinadas condições de cultivo podem ser implementadas para estudos específicos: hipóxia (Rehman *et al.*, 2004), privação do SFB (Oskowitz *et al.*, 2011) para produção de fatores angiogênicos e estímulos inflamatórios, co-cultura com outros tipos celulares como linfócito-T para avaliação do efeito imunossupressor das CMMs (Ren *et al.*, 2008), entre outros. Lee e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da adição de TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*) no cultivo de CMMs do tecido adiposo para identificação de proteínas envolvidas em processos inflamatórios, sendo possível a quantificação de 187 proteínas totais. Algumas dessas proteínas tiveram seu nível aumentado após o estímulo com TNF- α (Lee *et al.*, 2010).

Um elegante trabalho, recentemente publicado, avaliou e caracterizou o efeito da hipóxia (5% O₂) na secreção de proteínas em CMMs derivadas do cordão umbilical em biorreator de tanque agitado em comparação com normóxia. A utilização de biorreatores para esse fim possui a vantagem das condições de cultivo serem controladas, assegurando a reprodutibilidade dos experimentos. Como resultados, observaram que a concentração de oxigênio foi capaz de modular o secretoma celular, resultando em 85 proteínas diferencialmente secretadas em condições de hipóxia em comparação com normóxia. Proteínas como EF-2 (*Elongation factor 2*), timosina- β , UCHL1 (*Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*), clusterina, Prx1 (*Peroxiredoxin-1*), com funções relacionadas à inibição da apoptose, neuroproteção, atividade antioxidante e efeitos angiogênicos se mostraram *up-reguladas* (Teixeira *et al.*, 2015).

De maneira geral, de acordo com a análise do secretoma de CMMs nestes estudos, algumas classes de proteínas vêm sendo consistentemente observadas. Uma delas é a classe das metaloproteases (MMPs), que estão envolvidas com a mobilização, migração e diferenciação das CMMs (Mannello, 2006). Além disso, as MMPs podem ser consideradas um alvo validado para diversas doenças, podendo atuar como um novo modulador dos efeitos parácrinos de CMMs (Faça, 2012). De maneira similar, as interleucinas também aparecem como altamente secretadas pelas CMMs, e apresentam um amplo papel na imunomodulação, angiogênese e recrutamento de células do sistema imune para sítios de ferimentos (Meirelles Lda *et al.*, 2009).

Observa-se uma constante diferença no perfil proteômico das CMMs de acordo com a fonte de isolamento (ex. tecido adiposo, medula óssea, matriz do cordão umbilical) (Miranda *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2013), passagem celular (Mindaye *et al.*, 2013) e principalmente em relação às técnicas de expansão utilizadas. Em um estudo utilizando gel de análise 2D, o perfil de secreção de proteínas das CMMs isoladas da medula óssea, tecido adiposo, membrana sinovial e veia do cordão umbilical foram comparados. Os resultados mostraram maiores similaridades no secretoma de CMMs da medula óssea e tecido adiposo em comparação com células do cordão umbilical (Roche *et al.*, 2009). CMMs do cordão umbilical apresentam um perfil proteômico mais similar com as células-tronco embrionárias, devido à origem fetal.

Finalmente, é de se esperar que existam múltiplas proteínas relevantes para serem caracterizadas, uma vez que os efeitos parácrinos exercidos pelas CMMs são entendidos como ambiente-dependentes, e consequentemente são bastante dinâmicos. Além disso, devido ao fato do secretoma desempenhar um papel direto nas atividades biológicas das CMMs, a análise qualitativa e quantitativa das proteínas secretadas por essas células é um passo fundamental para identificar os fatores-chave no controle e regulação de vários processos biológicos influenciados por essas células.

1.3 Análise dos custos associados ao processo de expansão celular (“Costs of goods, COG”)

A análise dos custos (COG) associados ao processo de manufatura de um produto é uma importante ferramenta para acessar o potencial valor de uma tecnologia e também para melhorar continuamente o bioprocesso (Simaria *et al.*, 2014). O COG de um produto baseado em células (no caso, CMMs) envolve custos diretos (materiais de consumo) e indiretos (equipamentos, mão-de-obra). Além disso, a eficiência do processo (rendimento da expansão, porcentagem de recuperação celular, caracterizações pós-cultivo), escolha da tecnologia (planar/monocamada ou biorreatores) e recursos necessários são os parâmetros-chave que influenciam no valor do COG. Outros fatores relevantes incluem demanda e tamanho do lote assim como a dose necessária para a aplicação terapêutica. Na terapia celular, os custos são geralmente expressos em função das diferentes doses utilizadas, COG/dose (Jenkins e Farid, 2015).

O alto valor do COG é um dos principais obstáculos para a comercialização dos produtos baseados em terapia celular e está relacionado à complexidade, alta sensibilidade celular às condições de manufatura e aos materiais de consumo necessários. Os custos diretos de expansão possuem um impacto decisivo no COG de todo o processo, variando entre 45-60% em cultivos planares e 20-50% em tecnologias envolvendo microcarregadores (Hassan *et al.*, 2015).

Muitos produtos baseados em células têm enfrentado desafios para alcançar uma produção escalonável, robusta e de baixo custo. Esse fato contribuiu para várias falhas notáveis devido ao alto COG dos produtos, alta variabilidade dos processos e perda de eficácia. Consequentemente, a viabilidade comercial econômica das terapias celulares depende de uma produção eficiente de células em larga escala (Simaria *et al.*, 2014).

Até o presente momento, as terapias envolvendo CMMs alogênicas disponíveis comercialmente incluem Prochymal (Osiris, Columbia, MD) para doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aprovado no Canadá e Nova Zelândia, Cartistem (MEDIPOST, Seoul, Coreia do Sul) para a osteoartrite, aprovado na Coreia do Sul, Osteocel[®] para tratamento ósseo (NuVasive, San

Diego, CA, USA) e TEMCELL[®] para DECH a ser lançado esse ano (2016) pelo Japão em parceria com a Mesoblast.

Outro aspecto importante a ser considerado nos produtos destinados à terapia celular se refere às estratégias de reembolso. Tais estratégias devem ser analisadas, pois diferem muito entre os países e consequentemente, um produto comercialmente viável em um determinado país pode não ser em outro. Considerar a estratégia de reembolso no país selecionado para comercialização do produto irá permitir que o produto tenha uma viabilidade comercial favorável, isto é, que atinja uma satisfatória margem de lucro bruta (COG abaixo de 15% do valor do produto).

1.4 Considerações finais

As CMMs tem gerado muita expectativa em torno do seu potencial em aplicações na terapia celular desde sua descoberta na década de 80. Diversos ensaios clínicos em fases iniciais têm surgido para o tratamento de uma grande variedade de doenças. Dessa forma, com as CMMs progredindo no desenvolvimento clínico e movendo em direção às terapias celulares, o aprimoramento das tecnologias de expansão de CMMs para atender os exigentes requisitos das agências reguladoras é fundamental para a translação para prática clínica. Há um grande número de trabalhos na literatura visando a expansão eficiente de CMMs em sistemas de cultivo *in vitro*. Frascos *spinner* com microcarregadores, apesar de ser o sistema de cultivo mais descrito na literatura para a expansão de CMMs, apresentam algumas limitações práticas como, por exemplo, elevado risco de contaminação, procedimentos laboriosos, cultivo heterogêneo e dificuldade no monitoramento e controle dos parâmetros de cultivo. Apesar dos avanços, ainda há uma carência de conhecimentos para o estabelecimento de cultivos em biorreatores com alto rendimento e recuperação celular com adequada qualidade terapêutica. Sendo assim, o presente estudo mostra-se oportuno nesse cenário ainda não consolidado e pode contribuir na busca de um bioprocesso tecnicamente e economicamente viável para expansão e recuperação de CMMs. Importante mencionar que não

há trabalhos na literatura descrevendo de maneira comparativa a expansão de CMMs em diversos tipos de biorreatores em associação com a análise dos custos (COG) de todo o processo, tornando o presente trabalho ainda mais relevante.

É notório que há um aumento de trabalhos na literatura avaliando condições de cultivo livres de SFB e xenoantígenos para o isolamento e expansão de CMMs. Os resultados tem mostrado que o perfil de crescimento e expansão das CMMs em meios comerciais ou produzidos *in house* isentos de xenoantígenos é similar ao meio de cultura suplementado com o padrão SFB. Por ser uma abordagem recente, mais estudos precisam ser realizados e devem estar focados na utilização destes meios e suplementos alternativos ao SFB para expansão em larga-escala de CMMs, levando em consideração a eficácia, rendimento e viabilidade econômica do processo.

A análise do secretoma das CMMs é uma abordagem recente e pouco explorada, porém com muito potencial em função da gama de proteínas interessantes já identificadas. Pelo fato do secretoma desempenhar um papel direto na atividade biológica das CMMs, a análise qualitativa e quantitativa das proteínas secretadas representa um passo fundamental para identificar fatores-chave no controle e regulação de vários processos biológicos influenciados por essas células. Ainda que diversos trabalhos mostrem o perfil de proteínas secretadas pelas CMMs, as técnicas utilizadas não permitem identificar um perfil abrangente e completo. O presente trabalho utilizou a técnica de espectrometria de massas, tecnologia mais sensível, rápida e acurada para identificação e quantificação de uma extensa lista de proteínas secretadas. Tais proteínas apresentam elevado potencial terapêutico, pois estão envolvidas em diversos processos de reparo e regeneração de tecidos e órgãos lesados. A futura avaliação de proteínas relevantes nos sobrenadantes dos cultivos das CMMs em biorreatores poderá representar um método original e inovador para produção de produtos terapêuticos livres de células.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos principais o estabelecimento de um processo de expansão de CMMs baseado em biorreatores e a caracterização do secretoma destas células visando aplicações terapêuticas e biotecnológicas.

Para isso, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Expansão de CMMs do cordão umbilical (MCUs) em frascos multicamadas (HyperFlask[®], Corning) e nos biorreatores de leito-fixo (FibraStage[®]), fibra-oca (Quantum[®] Cell Expansion System) e tanque agitado (Celligen 310) visando identificar um processo escalonável que possibilite elevados níveis de expansão e recuperação de células funcionais em condições metabolicamente apropriadas e que mantenham suas propriedades biológicas pós-cultivo;
2. Comparação dos custos de expansão (*Cost of goods*, COG) dos diferentes sistemas de cultivo avaliados;
3. Expansão de MCUs no sistema de cultivo adequado em condições livres de soro fetal bovino e xenoantígenos;
4. Caracterização do secretoma das CMMs para determinação global de proteínas secretadas através da análise por espectrometria de alta resolução acoplado a cromatografia líquida (LC-MS/MS) e identificação de proteínas com promissor potencial terapêutico.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

3.1.1 Células estromais mesenquimais multipotentes e meios de cultura

Foram utilizadas CMMs humanas derivadas do cordão umbilical (MCUs) provenientes de um banco existente no Hemocentro de Ribeirão Preto (HCRP nº14906/2010) estabelecido pela Dra. Karen de Lima Prata (“Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular”, Processo HCRP 920/2009). Foi obtida a aprovação do comitê de ética para utilização destas células no presente projeto sob o número 286.371. O meio de cultura utilizado foi o α -MEM (Gibco-BRL, EUA) acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Penicillin – Streptomycin, Gibco-BRL, EUA), 2,6 g/L de Hepes (Gibco-BRL, EUA) e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (Merck, Brasil). O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Fetal Bovine Serum Characterized - HyClone™, EUA) e 10% de soro AB humano (produzido *in house*; dos Santos, 2015) para os cultivos realizados em condições livres de xenoantígenos.

Para os cultivos realizados em condições livres de SFB foram utilizadas MCUs provenientes de um banco estabelecido no Laboratório de Bioengenharia de Células Estaminais e Medicina Regenerativa, Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia do Instituto Superior Técnico (Universidade de Lisboa) previamente isoladas em condições livres de xenoantígenos (Simoes *et al.*, 2013). Utilizou-se o meio de cultura StemPRO® MSC SFM XenoFree (Gibco, Life Technologies, EUA), acrescido de 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Penicillin – Sterptomycin, Gibco-BRL, EUA) e 1% de Glutamax (Gibco, Life Technologies, EUA). Esse meio de cultura é manufaturado em condições BPM com uma mistura específica de proteínas, incluindo a albumina do soro humano, fatores de crescimento humano recombinantes e elementos traço com componentes de origem não-animal.

3.1.2 Tryple[®] Express

A Tryple[®] Express (Gibco, EUA) é uma enzima recombinante derivada de fermentação microbiana, sendo isenta de derivados animais/xenoantígenos, e foi utilizada para desaderir as células dos frascos T, dos microcarregadores e discos de Fibra-Cel nos experimentos.

3.1.3 Tripsina

A Tripsina (Invitrogen, EUA) é uma enzima porcina e foi utilizada para desaderir as células dos microcarregadores nos experimentos realizados em frascos T e biorreatores utilizando meio de cultivo suplementado com SFB.

3.1.4 Discos de Fibra-Cel

Os discos de Fibra-Cel (New Brunswick Scientific, EUA), utilizados no biorreator de leito fixo FibraStage, são formados por fibras de poliestireno e polipropileno, de diâmetro 6 mm e possuem a finalidade de fornecer um suporte para o ancoramento das células.

3.1.5 Microcarregadores

Nos cultivos em frasco *spinner* foram testados três diferentes tipos de microcarregadores: Cultispher-S (1,0 e 2,0 g/L) (Hyclone, EUA), Cytodex 1 (3,0 g/L) e Cytodex 3 (3,0 g/L) (GE Healthcare, Reino Unido). Nos cultivos livres de SFB, o microcarregador Cultispher-S foi previamente revestido com uma solução de CELLstart[™] CTS (substrato com composição definida para adesão celular, livre de xenoantígenos) (diluído a 1:100 em PBS) por 1 hora a 37 °C, com agitação intermitente (2 min a 750 rpm, 10 min OFF) usando o Thermomixer confort[®] (Eppendorf AG, Alemanha). O microcarregador Cultispher-S é macroporoso com matriz de gelatina (hidrólise parcial do

colágeno) que pode ser dissolvida com enzimas proteolíticas. O microcarregador Cytodex 1, não poroso, possui uma estrutura formada por ligações cruzadas de dextrana substituída com grupos N-N-dietilaminoetil com cargas positivas distribuídas por toda a superfície da microesfera, proporcionando uma boa adesão das células por atração eletroestática. Já o microcarregador Cytodex 3 é constituído por uma fina camada de colágeno desnaturado quimicamente e acoplado a uma matriz de dextrana reticulada. Para os experimentos realizados em condições livres de xenoantígenos, utilizou-se o microcarregador de plástico P-102L (copolímero de estireno) (Solohill, EUA).

As características físicas dos microcarregadores estão apresentadas na Tabela 4, com base nas informações fornecidas pelo fabricante.

Tabela 4 - Características gerais dos microcarregadores utilizados neste trabalho.

Características	Microcarregador			
	<i>Cytodex 1</i>	<i>Cytodex 3</i>	<i>Cultispher-S</i>	<i>Plástico P102-L</i>
Matriz	Dextrana reticulada	Colágeno desnaturado com matriz de dextrana	Colágeno	Copolímero de estireno
Área superficial (cm ² /g) *seco	4400	2700	7500	360
Densidade (g/mL)	1,03	1,04	1,04	1,02-1,03
Diâmetro (µm)	147-248	141-211	130-380	90-150
Poroso	Não	Não	Sim	Não

Fonte: Site GE Healthcare, Pall Corporation.

3.1.6 Garrafas estáticas

Para a expansão das MCUs em condições estáticas foram utilizados frascos de cultura de poliestireno (frascos T) com área superficial de 75 cm², 175 cm² (Greiner Bio-One, Alemanha) e frascos multicamadas (1720 cm²) (HyperFlask®, Corning, EUA). Nos cultivos em condições livres de SFB foram utilizados frascos T 75 cm² (Greiner Bio-One, Alemanha) pré-revestidos com

CELLstart[®] CTS[®] na concentração de 1:100 (Invitrogen, USA). Os frascos foram mantidos em atmosfera úmida (85%) a 37 °C e 5% de CO₂.

3.1.7 Frasco *Spinner*

Para os cultivos iniciais foi utilizado o Frasco *spinner* de 100 mL (Bellco, EUA) com agitador magnético de pás (90°).

3.1.8 Biorreator de leito fixo (FibraStage[®])

O biorreator FibraStage[®] (New Brunswick Scientific, EUA) é um biorreator descartável de leito fixo com volume total de 500 mL. No leito fixo, estão confinados 2200 discos de Fibracel (área superficial 12000 cm²) (item 3.1.4) para permitir o ancoramento das células (Figura 4A). Possui uma plataforma que expande e comprime na base da garrafa descartável. Durante a compressão, o meio de cultura entra em contato com as células provendo nutrientes e, na expansão, o meio de cultura retorna para a base removendo metabólitos tóxicos e proporcionando uma eficiente troca gasosa (Figura 4B).

(A)

(B)

Fonte: Site New Brunswick Scientific.

Figura 4 – (A) Imagem ilustrativa do biorreator FibraStage[®]; **(B)** Funcionamento do biorreator com a compressão e expansão da plataforma.

3.1.9 Biorreator de tanque agitado (Celligen 310)

O biorreator Celligen 310 (New Brunswick Cientific, EUA) (Figura 5) é um biorreator do tipo tanque agitado com volume de 2,5 L com monitor de controle de tela sensível ao toque, impelidor tipo *pitched-blade*, amostrador estéril, eletrodos de pH e oxigênio dissolvido. O controle do pH é realizado através de bombas peristálticas com a adição de NaHCO_3 (8% v/v) e H_2SO_4 (2M) e o controle do oxigênio dissolvido realizado através da aeração superficial de mistura de gases (ar sintético, O_2 , N_2).

Fonte: Site New Brunswick Scientific.

Figura 5 - Imagem ilustrativa do biorreator Celligen 310.

3.1.10 Biorreator de fibra-oca (Quantum[®] expansion system)

O biorreator Quantum[®] (Figura 6A) consiste em um sistema de expansão em larga escala totalmente fechado e descartável. É basicamente um cilindro composto de membranas semipermeáveis na forma de capilares denominado EIC (espaço intracapilar) confinadas dentro de uma carcaça cilíndrica (Figura 6B). As células normalmente são inoculadas no EIC e o meio de cultura flui em seu interior. Devido ao caráter poroso das fibras ocorre a troca de nutrientes e

metabólitos. No espaço extracapilar (EEC), entre os capilares e a carcaça cilíndrica, ocorre circulação de meio de cultura oxigenado para o sistema. Assim, a população celular cresce no EIC do cartucho ao receber os nutrientes provenientes do meio extracapilar que se difundem através das fibras do biorreator. Os produtos metabólicos inibitórios (gerados como consequência do crescimento celular) difundem-se na direção oposta e diluem-se no meio que circula no EEC (Figura 6C). O processo é computadorizado e controlado por uma interface com tela sensível ao toque, permitindo ao usuário modificar parâmetros e tarefas associadas ao crescimento das células.

(A)

(B)

(C)

Fonte: Figuras (A) e (B) – Site Terumo BCT; (C) – Acervo pessoal.

Figura 6 - (A) Biorreator Quantum[®] expansion system (Terumo BCT, EUA); **(B)** Fibras dispostas dentro da carcaça cilíndrica; **(C)** Ilustração das células crescendo no interior das fibras ocas (corte transversal) no EIC e o fluxo de nutrientes e de metabólitos tóxicos no interior do biorreator.

3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Quantificação celular

A determinação da densidade celular foi obtida pelo método de exclusão do corante azul de Tripan (0,4%, Sigma Aldrich, EUA) em câmara de Neubauer (hemacitômetro). Para minimizar os erros de contagem, foram contados oito quadrantes. A média e o desvio padrão das medidas de densidade e viabilidade celular foram determinados considerando 2 eventos de contagem, sendo cada evento representado pela contagem de 4 quadrantes, utilizando o software Microsoft Excel 2007.

A quantificação das células aderidas aos suportes (microcarregadores e discos Fibra-Cel) foi realizada utilizando o kit baseado no MTT ou Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich, EUA), de maneira indireta por espectrofotometria ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Consiste em um método colorimétrico que mensura a atividade da enzima mitocondrial desidrogenase que reduz o MTT (amarelo) ao formazan (roxo). Para a aplicação do método baseado no MTT foi necessária a preparação de uma curva de calibração da densidade celular em função da absorbância antes de iniciar os experimentos de expansão de MCUs (Apêndice A, CD).

Para a reação, adicionou-se 20 μL da solução MTT em 200 μL das amostras que foram, em seguida, homogeneizadas e colocadas na incubadora de CO_2 a 37 °C por 4 horas. Após esse período de reação, uma solução ácida de isopropanol foi adicionada para a solubilização do cristal de formazan, de cor azul escuro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas para a sedimentação dos microcarregadores e dos restos celulares, e os sobrenadantes foram analisados, em triplicata, no espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific).

Alternativamente, a densidade das células aderidas aos microcarregadores foi avaliada também através de contagem em câmara de Neubauer após a dissociação das células dos suportes utilizando enzima Tryple/tripsina e Tryple 10X com colagenase (1%) durante 10-30 minutos.

3.2.2 Análise de glicose, glutamina e ácido láctico

A determinação da concentração de glicose, glutamina e ácido láctico presente nos sobrenadantes dos cultivos foi realizada enzimaticamente no analisador bioquímico YSI 2700 (Yellow Springs Instruments, OH).

3.2.3 Análise de amônia

A análise de amônia foi realizada nas amostras do sobrenadante do meio de cultivo em eletrodo íon seletivo. O medidor da Thermo Scientific (EUA), modelo ORION 710A, foi utilizado para obter as medidas de concentração (mg/mL). Para a análise, preparou-se previamente uma curva de calibração a partir de uma solução padrão contendo amônia, conforme indicado pelo fabricante.

3.2.4 Imunofenotipagem das CMMs

As MCUs pré e pós-cultivo em frascos T, *spinner* e biorreatores foram analisadas em relação a seus antígenos de superfície celular por meio de marcação com anticorpos monoclonais específicos (imunofenotipagem). Após a marcação, as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FASCalibur BD, USA) utilizando o software *CELLQuest™* (Becton Dickinson, USA) disponível no Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, sob a coordenação do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas. Foi estabelecido um painel de 16 anticorpos monoclonais: CD13, CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49e, CD51/61, CD73, CD90, CD105, CD 106, CD166, HLA classe I e classe II.

As MCUs foram subdivididas em alíquotas de 100µL de suspensão celular em solução tampão fosfato (PBS) na concentração de 1×10^5 células/tubo e marcadas com 5µL do anticorpo específico por 20 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Após a marcação, as células foram lavadas 2x com PBS e ressuspensas em 100 µL de PBS para análise no citômetro de fluxo. Foram analisados 10.000 eventos celulares para cada

marcação imunofenotípica e foram gerados gráficos de histograma para imunomarcação e em “Dot Plot” para definição do tamanho/granularidade interna.

3.2.5 Potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos

A avaliação do potencial de diferenciação das células foi realizada antes e após o cultivo das MCUs em biorreatores para verificar se o sistema de cultivo proposto alterava essa propriedade.

Um total de 4×10^4 células foram cultivadas em placas de cultura 24 poços. Após 24 horas em condições normais de cultura e aproximadamente 60% de confluência, o meio α -MEM suplementado com 15% SFB (Hyclone, EUA), 1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA), 0,4 mM de insulina e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado para a diferenciação em adipócitos. Para diferenciação em osteócitos, adicionou-se o meio α -MEM suplementado com 7,5% SFB (Hyclone, EUA), 0,1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA), 20 mM de ácido ascórbico e 1 M de β -glicerolfosfato (Reagem, Brasil). Realizou-se troca do meio de cultivo suplementado a cada 48h e após 3-4 semanas, as células foram coradas com Sudan II escarlate (MERCK, Alemanha) para visualização dos depósitos de gordura (adipócitos) e pelo método de von Kossa para visualização dos depósitos de cálcio (osteócitos).

Para a diferenciação em condrócitos, MCUs expandidas foram plaqueadas como pequenas gotículas (10 μ L), com altas densidades celulares (1×10^7 células) em placas de cultura de baixa aderência (Corning, EUA). Após 30 minutos, o meio de DMEM suplementado com 100 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA), 20% de albumina, 20 mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA) e 1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado para a diferenciação em condrócitos. Realizou-se troca do meio de cultivo suplementado a cada 72h durante 14 dias. A avaliação da diferenciação em condrócitos foi realizada com base na síntese de proteoglicanos, utilizando o corante Azul de Alciano 1% (Sigma Aldrich, EUA).

Para os experimentos realizados em meio de cultura livre de SFB e xenoantígenos, o mesmo procedimento anterior foi realizado utilizando-se os kits: StemPro[®] Adipogenesis, Osteogenesis and Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco, EUA) para diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos, respectivamente. A coloração utilizada foi a mesma anteriormente descrita.

3.2.6 Ensaio de inibição da proliferação de linfócitos-T

O ensaio de inibição da proliferação de linfócitos-T foi realizado antes e após a expansão das MCUs em biorreator de tanque agitado em condições livres de SFB e xenoantígenos. Para isso, células pré e pós-cultivo foram co-cultivadas em diferentes concentrações (1:5, 1:10 e 1:50) com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) marcadas com 5 μ M de CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Molecular Probes, EUA) e estimuladas com Dynabeads (Gibco, Norway) (3×10^5 células/poço). Após 5 dias de cultivo, as células foram recuperadas e incubadas com CD3-PercP (Becton Dickinson, CA) por 15 minutos no escuro e lavadas com PBS 1x. Então, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur[™] (Becton Dickinson, EUA). 10 000 eventos foram capturados e analisados utilizando o software CELLQuest[™]. Experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.7 Coloração das células com DAPI

Durante os cultivos em frasco *spinner* e biorreatores, células + microcarregadores foram coradas com DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Life Technologies, EUA) para visualização da distribuição das células aderidas ao suporte. A coloração das células com DAPI evidencia o núcleo celular e permite uma avaliação qualitativa da viabilidade celular, uma vez que apenas as células com integridade nuclear incorporam o reagente DAPI. Dessa forma, retirou-se 200 μ L de células + microcarregadores, lavou-se 1x com PBS (1x) e fixou-se por 20 minutos através da adição de 400 μ L de

paraformaldeído (4%). Após a fixação, adicionou-se 400 µL de solução de DAPI (protegido da luz) por 10 minutos. Lavou-se repetidas vezes com PBS 1x e os núcleos corados (azuis) foram visualizados pelo microscópio de fluorescência Leica DMI 3000B. As imagens foram obtidas através do software Nikon ACT-1.

3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observar a morfologia das células aderidas aos suportes (discos de Fibra-Cel e microcarregadores), os complexos célula-suporte foram fixados em 2,5% (vol./vol.) de glutaraldeído (Sigma-Aldrich, EUA) e 4,0% (vol./ vol.) de paraformaldeído durante 1 h. Após esse período, as amostras foram lavadas três vezes com tampão de cacodilato (0,2 M, pH 7,2) (Sigma-Aldrich, EUA) durante 10 minutos e foram imersas em tetróxido de ósmio (1%) (Sigma-Aldrich, EUA) durante 1 h. Em seguida, as amostras foram desidratadas através de uma série graduada de etanol (50%, 70%, 95%) durante 15 minutos cada e duas vezes em 100%. As amostras foram secas usando o ponto crítico CPD030 (BAL-TEC AG, Liechtenstein) e então revestidas com ouro e examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de alto vácuo JSM-6610LV (JEOL). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

3.2.9 Análise dos custos (COG) dos diferentes sistemas de cultivo para expansão das MCUs

A análise dos custos de expansão (COG) nos diferentes sistemas de cultivo utilizados neste trabalho (frascos multicamadas (MC); biorreatores de leito fixo (LF), tanque agitado (TA) e fibras ocas (FO)) foi realizada em parceria com a Dra. Suzanne Farid (Department of Biochemical Engineering, The Advanced Centre for Biochemical Engineering) da Universidade College London (UCL).

3.2.9.1 Estudo de caso

A análise dos custos dos diferentes sistemas de cultivo de expansão utilizadas no trabalho se baseou na utilização das CMMs derivadas da matriz do cordão umbilical (MCUs) para o tratamento da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH). O ensaio clínico para este tratamento está sendo realizado pelo Hemocentro de Ribeirão Preto (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo) em fase I/II (processo número: 404622 / 2012-7). Nesta fase, o objetivo do estudo clínico é avaliar o potencial terapêutico das MCUs no tratamento da DECH aguda após transplante de célula-tronco hematopoéticas (CTH). Para esse ensaio clínico, as MCUs estão sendo expandidas usando frascos-T, mas devido às limitações já mencionadas, outros sistemas de cultivo foram testados experimentalmente, a fim de prever o seu desempenho em um processo de expansão de CMMs em larga escala. Durante a fase experimental, a taxa de proliferação, o rendimento de recuperação e viabilidade celular para os diferentes sistemas de cultivo foram avaliados. Este estudo foi estendido para calcular a viabilidade econômica de cada sistema de cultivo em escala comercial.

Assumiu-se uma demanda máxima anual de 10 000 pacientes para essa análise com base no número anual de transplante de CTH alogênico (30000) (<http://www.mesoblast.com/>) e uma taxa de incidência de DECH de cerca de 30% - 60% (Wingard *et al.*, 1989; Barton-Burke *et al.*, 2008). Idealmente, esses pacientes estão espalhados por todo o mundo e, portanto, o peso médio do paciente utilizado foi o peso médio mundial, ~ 69 kg (Walpole *et al.*, 2012). Os pesos mínimos e máximos dos pacientes também foram utilizados nesta análise, e foram identificados como sendo 60,7 kg (África) e 80,7 kg (América do Norte), respectivamente (Walpole *et al.*, 2012). Como as MCUs tem um limitado potencial de expansão, este estudo primeiramente identificou o número de bancos de células necessários para satisfazer a demanda nos diferentes sistemas de cultivo e os custos associados. Após isso, os custos de produção por dose para cada fase dos diferentes processos de produção celular (banco de células, cultura das células, processo *downstream* e transporte) foram calculados com os respectivos desvios gerados por variações no processo.

Além disso, foram identificados os fatores de custo-chave para cada etapa do processo e foi avaliada a rentabilidade dos diferentes sistemas de cultivo em diferentes cenários de reembolso. O reembolso se refere ao montante total que o governo está disposto a pagar/custear pelo tratamento de uma doença específica.

3.2.9.2 Descrição da ferramenta

A ferramenta para análise dos custos foi desenvolvida em Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA) combinada com a otimização de força bruta macro construída usando VBA (Microsoft Corporation, Redmond, WA) e simulações de Montecarlo usando @Risk[®] (Palisade Corporation, Newfield, Nova Iorque) (Simaria *et al.*, 2014) para avaliar o COG por milhão de células nos diferentes sistemas de cultivo considerando vários cenários em um menor tempo. Esta ferramenta simula cada dia de uma *facility* de um único produto operando 335 dias por ano, com duas paradas para manutenção anuais (verão e inverno). Os parâmetros econômicos utilizados para calcular o COG total foram diretos e indiretos. Os custos diretos incluídos nesta análise foram: meio de cultura, tripsina/TrypLE, controle de qualidade (CQ) e frascos de cultura de células/ biorreatores. Os custos indiretos utilizados nesta análise foram os custos de mão-de-obra e depreciação dos equipamentos. Esta ferramenta foi também modificada para refletir as diferentes escalas para os diferentes sistemas de cultivo e os protocolos associados. Além disso, foi incluída a fase de banco de células (banco mestre e de trabalho). Isto foi realizado usando o número de células que podem ser isoladas a partir de uma única unidade do cordão umbilical e a posterior expansão através de 3 passagens até a formação do banco de células mestre (BCM). Em seguida, foram contabilizadas mais 2 passagens para formar o banco de trabalho (BT). Os custos de transporte (*shipping*) também foram calculados.

3.2.9.3 Suposições-chave

Banco de células

O protocolo atual utilizado pelo Hemocentro de Ribeirão Preto permite o isolamento de 1×10^6 à 5×10^6 CMMs por cordão umbilical. Essa faixa foi usada para produzir a variação no número de doadores necessários para cumprir a demanda anual. Um valor médio de 3×10^6 células por banco foi selecionado. Assumiu-se também que 5×10^7 células de cada BCM foram usadas para testes de controle de qualidade. Estas células foram cultivadas em frascos de cultura por 3 passagens, formando o BCM e após este processo, as células foram criopreservadas. As células foram descongeladas quando necessário para produzir o BT. Durante a formação do BT, mais duas passagens foram realizadas antes da inoculação nos sistemas de cultivo.

Utilizando o número de células iniciais isoladas do cordão umbilical, a taxa de proliferação e o fator de expansão, foi possível avaliar o número de bancos de células necessários de acordo com a equação:

$$N_{CB} = \frac{D}{(DSP_{Yi} \times (1 - BFR) \times CR_{Yi}) \times (FI_i \times C_{UC} \times 2^{\left(7 \times \frac{N_{ES}}{Dt}\right)})} \quad (1)$$

onde D é a demanda, DSP_{Yi} e CR_{Yi} são o rendimento do processo pós-cultivo e a taxa de recuperação celular de cada tecnologia i. BFR é a taxa de insucesso do processo (5-10%), FI_i fator de expansão da tecnologia i, C_{UC} é o número inicial de células no cordão umbilical i, N_{ES} é o número cumulativo de estágios de expansão do BCM para o BT e Dt é o tempo de duplicação.

Realizou-se a suposição de que o número máximo de bancos de células que uma única equipe pode processar por ano é 100. Esta suposição foi baseada na experiência da equipe do Laboratório de Terapia Celular, Hemocentro de Ribeirão Preto.

A Tabela 5 a seguir ilustra os parâmetros gerais utilizados e produzidos pela ferramenta de economia do processo nesse trabalho.

Tabela 5 - Parâmetros gerais utilizados e produzidos pela ferramenta de economia do processo.

Processo	Classe	Parâmetro	Valor	Unidade
Geral	Atributos	Peso paciente	Tr(60,7,69,80,7)	kg/paciente
		Demanda	10 000	Pacientes/ano
		Nr lotes	100	Lotes/ano
		Período de depreciação	8	Anos
		Lang factor	23,67	-
		Tempo de trabalho	8	h
		Tempo de sala limpa	6,4	h
		Taxa insucesso	Tr(0,5,10)	%
		Razão gerente de linha	1,5	-
		Razão operador	1,3	-
	Custos	Meio de cultura	450	US\$/L
		Tryple e Trypsina	98	US\$/L
		Salário operador	120 000	US\$/operador por ano
Banco de células	Atributos	Células por cordão umbilical	Tr(1×10^6 , 3×10^6 , 5×10^6)	-
		Tempo duplicação células	36	h
		Número de passagens para formar BCM	3	Passagens
		Número de passagens para formar BT	2	Passagens
		Frasco de cultura utilizado	Frasco multicamada 1 (CS1), 2 (CS2), 40 (CS40)	
		Número de frascos utilizados	1 (CS1), 1(CS2), 47 (CS40)	Unidades por banco de célula
		Consumo de meio de cultura	0,25 (CS1 & CS2), 0,16 (CS40)	mL/cm ²
		Número de incubadoras	3	Unidades
		Número de operadores	4	Operadores
		Células retiradas para testes	5×10^7	Células/banco
		Número final de células atingidas por banco de células (pós BT)	$5,04 \times 10^{10}$, $1,06 \times 10^{10}$	Células /banco
	Custos	Custo por frasco de cultura	60(CS1), 73(CS2), 1265 (CS40)	US\$/unidade
		Custo incubadora	30 000	US\$/unidade
		Controle de qualidade (CQ)/BCM	75 000	US\$/BCM
Expansão celular	Atributos	Microcarregador utilizado	Cultispher® S	-
		Concentração do microcarregador utilizada	2	g/L
	Custos	Custo microcarregador	5	US\$/g
		Custos CQ	3333	US\$/lote
Transporte	Atributos	Número de operadores requeridos	3	Operadores/ano
		Vials/transporte	50	-
		Células/vial	60 milhões	Células/vial
	Custos	Custo por transporte	3774	US\$

Custos de transporte (shipping)

Os únicos custos considerados nesta etapa foram os custos de mão-de-obra e os custos de transporte. Os custos de transporte foram realizados através de uma entrevista com uma pessoa qualificada e experiente em materiais criogênicos. Eles identificaram que o custo do transporte entre continentes é de cerca de US\$ 2619 e US\$ 4075; portanto, o valor escolhido nesta análise foi a média de US\$ 3347. Estes custos incluem a coordenação com o destino de escolha para o tratamento, a documentação adequada, o equipamento e a coordenação com o sistema de segurança do aeroporto, com o intuito de evitar o raio-X do produto.

3.3 Procedimentos Experimentais

Os fluxogramas a seguir ilustram todas as etapas realizadas durante o presente trabalho. Estas etapas foram divididas em células como produto: expansão das MCUs nos sistemas de cultivo (Figura 7) e células como biofábrica: análise do secretoma (Figura 8).

Figura 7 - Fluxograma esquemático simplificado de todas as etapas realizadas no processo de expansão das MCUs nos diferentes sistemas de cultivo e análise dos custos associados.

Figura 8 - Fluxograma esquemático simplificado de todas as etapas realizadas no processo de análise do secretoma das MCUs.

3.3.1 Expansão das MCUs em monocamada e biorreatores

3.3.1.1 Cultivos em frascos T e multicamadas

Para os cultivos em frascos T (75 cm²) e frascos multicamadas (HyperFlask®, Corning, EUA), 5000 células/cm² foram inoculadas na 4ª passagem (n=3, três doadores diferentes) em 15 e 550 mL de meio de cultura α-MEM +10% SFB, respectivamente, à 37°C e 5% de CO₂. Realizou-se troca de 50% do meio de cultura no dia 3. Após 6 dias de cultivo, as células foram recuperadas utilizando-se Tryple® Express e o número de células foi quantificado pelo método de exclusão pelo corante azul de Tripán.

3.3.1.2 Cultivos em frasco Spinner

As células foram descongeladas (4ª passagem) e transferidas para frascos de cultura de 75 cm² para expansão inicial, mantidas em incubadora à 37° C e 5% de CO₂. Após atingir a confluência de aproximadamente 80%, as células foram desaderidas com Tryple® e inoculadas em uma maior quantidade

de frascos T de 75 cm². A morfologia celular durante a expansão foi observada com a utilização de um microscópio invertido.

Após atingir o número de células suficientes ($1,25 \times 10^5$ células/mL), inoculou-se em frasco *spinner* (100 mL, com volume de trabalho de 50 mL) já contendo meio de cultura e microcarregador. Utilizou-se a concentração de 3,0 g/L para os microcarregadores Cytodex 1 e 3 e 2,0 g/L para o Cultispher-S. O preparo e esterilização dos microcarregadores foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos foram divididos em 2 fases: a fase para a adesão e a fase para a expansão celular. A duração da fase de adesão foi de 6 horas, com agitação intermitente: de 30 em 30 minutos por 30 segundos a 40 rpm. Para a fase de expansão utilizou-se agitação constante de 50 rpm.

Para avaliar a adesão das células nos microcarregadores, foram retiradas amostras do sobrenadante a cada uma hora para determinação da densidade celular em suspensão e a viabilidade.

Para acompanhar o crescimento celular durante a fase para a expansão foram retiradas amostras a cada 24 horas para quantificação celular e para posteriores análises de glicose, glutamina, ácido láctico e amônia. As células livres em suspensão foram quantificadas utilizando o método de exclusão pelo corante azul de tripan. Já para as células aderidas nos microcarregadores, a quantificação foi determinada através do método MTT.

Nos experimentos em condições livres de xenoantígenos, MCUs previamente expandidas em condições estáticas foram inoculadas no frasco *spinner* ($1,0 \times 10^5$ células/mL) com o microcarregador Cultispher-S (1 g/L) revestido com CELLStart (1:100) e meio de cultura StemPRO[®] MSC SFM. Durante as primeiras 24 horas, a agitação foi mantida contínua a 40 rpm com 40 mL de meio de cultura. Após 24 horas, aumentou-se a agitação para 50 rpm. Adotou-se a estratégia de batelada alimentada com adição de 20 mL de meio de cultura nos dias 2 e 4 atingindo um volume final de 80 mL. Para o monitoramento do crescimento celular, duas amostras diárias de 500 µL da suspensão celular (células+microcarregadores) foram coletadas. Assim, adicionou-se 1 mL de tripsina (1%) para degradação do microcarregador e posterior recuperação celular (isto é, sem necessidade de filtração). A

densidade e a viabilidade das células foram determinadas pelo método de exclusão utilizando o azul de Tripan. O sobrenadante coletado (1 mL) foi armazenado para posteriores análises do metabolismo celular.

3.3.1.3 Biorreator de leito fixo (FibraStage®)

Depois de obtida a concentração de células através do cultivo em garrafas estáticas (frascos T de 175 cm²), as células foram inoculadas na quinta passagem (1,25x10⁵ células/mL ou 5000 células/cm²) (n=3, três doadores diferentes) na garrafa FibraStage® contendo 500 mL de meio de cultura α -MEM +10% SFB e 10 gramas de Fibra-Cel. A duração da fase de adesão foi de 6 horas. Para avaliar a adesão das células nos discos (Fibra-Cel), foram retiradas amostras do sobrenadante a cada duas horas para determinação da densidade celular em suspensão e a viabilidade.

O biorreator de leito fixo foi mantido em incubadora à 37°C, 5% de CO₂ e 85% de umidade. Os experimentos foram realizados utilizando os parâmetros: velocidade de compressão da plataforma (UP): 1,0 mm/seg. / tempo de permanência da plataforma na posição comprimida (THT): 10 seg.; velocidade de expansão da plataforma (DOWN): 1,0 mm/seg / tempo de permanência da plataforma na posição expandida (BHT): 30 min. Amostras diárias foram retiradas (10 discos) para contagem celular na suspensão, quantificação das células aderidas pelo método enzimático MTT, verificação do pH e análise do metabolismo (consumo de glicose e glutamina e produção de ácido lático e amônia). Foram realizadas trocas de 50% do meio de cultivo a partir do 5º dia de experimento.

Após 7 dias de cultivo, as células foram recuperadas e quantificadas. Para a recuperação das células, removeu-se o meio de cultura do biorreator e adicionou-se 300 mL de PBS. Nesta fase de lavagem, o biorreator foi mantido no ciclo UP: 2 mm/s , THT: 10 seg e DOWN: 2mm/s, BHT: 10 seg por 10 minutos. Uma vez removido o PBS, foram adicionados 300 mL de Tryple® 10x com o ciclo UP: 2 mm/s, THT: 5 min e DOWN: 2mm/s, BHT: 0 seg por 30 minutos. Um novo ciclo foi realizado com 300 mL de Tryple® para recuperar a maior quantidade possível de células.

3.3.1.4 Biorreator de tanque agitado (Celligen 310)

Para o cultivo das MCUs em biorreator de tanque agitado, utilizou-se o biorreator de 2L Celligen 310 (item 3.1.9) com volume de trabalho de 800 mL. As condições de cultivo padrão dos experimentos foram: pH 7,30, oxigênio dissolvido mantido em 20% através da aeração superficial e temperatura 37°C.

Como se trata de uma célula aderente utilizou-se como suporte de ancoramento o microcarregador Cultispher-S. Assim, as células foram inoculadas na quinta passagem ($7,5 \times 10^4$ cél/mL ou 5000 células/cm²) utilizando-se meio de cultura α -MEM com 10% SFB. A fase de adesão consistiu em uma agitação intermitente: agitação a 40 rpm de 30 em 30 minutos por 30 segundos por 6 horas. Após esse período, manteve-se agitação constante em 50 rpm. Amostras diárias (5 mL) foram retiradas para quantificação das células aderidas e em suspensão, verificação do pH e análises metabólicas. Foram realizadas trocas de 50% do meio de cultivo a partir do 4º dia de experimento. Após 7 dias de cultivo, as células foram coletadas, transferidas para 5 tubos Falcon de 50mL, lavadas 2x com PBS após centrifugação a 1200rpm por 5min sem aceleração para não danificar os microcarregadores e as células. O *pellet* foi então ressuspenso em 200 mL de Tryple® 1x por 30 min e transferido para 2 frascos *spinner* (80 rpm) para desadesão celular e quantificação do número de células totais recuperadas no experimento.

Para os experimentos utilizando condições livres de SFB, $2,5 \times 10^4$ células/mL foram inoculadas com 1g/L de microcarregador Cultispher-S pré-revestido com CELLstart (1:100) em 800 mL de meio de cultura StemPro® MSC SFM XenoFree. A fase de adesão foi realizada por 24 horas a uma agitação contínua a 30 rpm. Assim, aumentou-se a agitação para 40 rpm e após 48 horas, 50 rpm. Amostras de 1 mL foram coletadas diariamente (duplicata) para monitoramento do crescimento celular, utilizando o mesmo protocolo descrito para o frasco *spinner*.

Nos experimentos empregando meio de cultura suplementado com 10% soro AB humano (livre de xenoantígenos), um passo de pré-adesão celular foi realizado em frasco *spinner* antes da inoculação em biorreator de tanque agitado. Para isso, 4×10^4 células/mL ($1,1 \times 10^4$ células/cm²) foram inoculadas em

200 mL de meio de cultura com 2g (10g/L) de microcarregador de plástico P102-L. Durante os 3 primeiros dias, empregou-se uma agitação intermitente: 2 minutos agitando a 30 rpm seguido por 15 minutos estático. No dia 3, 200 mL de meio de cultura e 2 g de microcarregador foram adicionados; e no dia 4 células+microcarregadores foram transferidos para o biorreator de tanque agitado completando-se o volume final de 800 mL (concentração final de microcarregador – 5g/L). Amostras de 1mL foram coletadas diariamente (duplicata) e as células recuperadas utilizando-se a combinação de Tryple 10x+ colagenase 2 mg/mL sob agitação por 7 minutos. A quantificação foi realizada utilizando o método de exclusão por azul de tripan.

Utilizou-se MCUs provenientes de três doadores diferentes (n=3) em cada condição.

3.3.1.5 Biorreator de fibra-oca (Quantum[®] expansion system)

Previamente à inoculação das células (aproximadamente 18 horas), realizou-se um pré-revestimento das fibras com fibronectina (5mg, Sigma Aldrich, EUA) para facilitar a adesão celular. Após esse período, adicionou-se PBS para realização de uma pré-lavagem e posteriormente, meio de cultura (α -MEM + 10% SFB) foi adicionado no sistema. O meio de cultura foi oxigenado com a mistura de gases (5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂). Assim, MCUs foram inoculadas na 5ª passagem ($21-60 \times 10^6$ células) no espaço intracapilar (EIC) e iniciou-se a adesão celular por um período de 24 horas. Após esse período, as células foram alimentadas através de um fluxo contínuo de meio de cultura, com remoção contínua e passiva para a bolsa de descarte. O fluxo de meio de cultura no EIC foi inicialmente ajustado a uma taxa de 0,1 mL/min. Foi realizada amostragem diária de sobrenadante do meio de cultura para análises de glicose e ácido láctico. A taxa do fluxo de meio de cultura no espaço intracapilar foi aumentada quando o lactato atingiu uma concentração elevada (8-9 mM) e/ou glicose em baixa concentração (1-0,5 mM).

Após 5-6 dias de cultivo, as células foram tripsinizadas e recuperadas. Para isso, dois ciclos de ação da enzima tripsina (360 mL) foram realizados por

8 minutos cada para recuperação da maior quantidade possível de células. Utilizou-se dois doadores diferentes (n=2).

A Figura 9 ilustra os principais passos realizados para expansão das MCUs no biorreator de fibra-oca.

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 9 - Procedimento simplificado das principais etapas realizadas para expansão das MCUs no biorreator de fibra-oca.

O esquema a seguir ilustra todo procedimento experimental realizado nos cultivos das MCUs em biorreatores e caracterizações pós-cultivo (Figura 10).

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 10 - Representação esquemática do procedimento adotado nos experimentos realizados para expansão das MCUs em biorreatores.

3.3.2 Análise do secretoma das CMMs

3.3.2.1 Obtenção do secretoma e fracionamento de proteínas

O meio de cultura enriquecido gerado através dos cultivos planares (frascos T) após 48 horas sem a presença de SFB foi caracterizado quanto ao conjunto de proteínas secretadas. O meio de cultura contendo as proteínas secretadas foi concentrado inicialmente para um volume inferior a 5 mL em filtro do tipo centricon (Millipore) com massa molecular de corte de 5 kDa, sendo o “*flow-through*”, composto por pequenas proteínas e peptídeos. As amostras foram ressuspensas em 200 μL de tampão uréia 8M/ tris 0,1 mM pH 8,0 para quantificação do conteúdo proteico pelo método de Bradford.

Após quantificação, alíquotas de 30 μg de proteína foram fervidas por 5 min com *Laemmli Sample Buffer* (BioRad) acrescido de ditiotretol - DTT (10

µg/µL) na proporção 1:1 para a desnaturação das proteínas. Após resfriarem à temperatura ambiente, foram alquiladas com 50 µg/µL de iodoacetamida (IAA) na proporção 1:5 por 20 minutos no escuro. Aplicaram-se as amostras no gel de SDS-PAGE 10%. A eletroforese foi realizada com 100V por aproximadamente 2 horas. O gel foi corado com Coomassie Coloidal G-250 *overnight*.

As amostras provenientes de gel SDS-PAGE foram recortadas de maneira a separar as proteínas de alta abundância, conforme intensidade do tingimento com Coomassie, para aumentar a amostragem de íons (peptídeos) detectados pelo espectrômetro de massas permitindo assim a identificação de proteínas de baixa abundância. Então, cada raia do gel foi seccionada em 6 fragmentos iguais de 1 cm cada, os quais foram lavados 6 vezes com acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 0,1M e mantidos *overnight* para descorar. Em seguida as amostras foram lavadas por 5 minutos com acetonitrila 100% e secas por 30 minutos em *Speed Vac*[®]. As amostras foram reidratadas em 20 µL de solução NH₄HCO₃ 100 mM contendo 0,5 µg de tripsina modificada (Promega). Após a reidratação das bandas por cerca de 30 minutos, foram adicionados 100 µL de NH₄HCO₃ 0,1M. A reação foi mantida a 37°C sob agitação *overnight*. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e os peptídeos foram extraídos das bandas sob agitação com cada uma das seguintes soluções: 50% ACN/0,1% ácido fórmico, 70% ACN/0,1% ácido fórmico e 100% ACN/0,1% ácido fórmico. As soluções de extração dos peptídeos foram combinadas e secas em *Speed Vac*[®] para posterior análise por espectrometria de massas.

3.3.2.2 Identificação das Proteínas por Espectrometria de Massas

A mistura de peptídeos resultante da digestão com tripsina foi analisada em um espectrômetro de massas LTQ-ORBITRAP (Modelo Elite - Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia nanoflow. Toda a aquisição de dados foi realizada em colaboração com o laboratório da Dra Sharon J. Pitteri, Stanford University, School of Medicine (Stanford, Califórnia). A separação cromatográfica líquida foi realizada em uma coluna de 25 cm

(Picofrit 75µm ID, New Objectives), empacotada no próprio laboratório utilizando-se resina Magic C18. A separação foi realizada com gradiente de 5-40% de acetonitrila / ácido fórmico 0,1% em fluxo de 250nL/min. Os espectros foram adquiridos em modo “*data-dependent*” na faixa de m/z 400 – 1800 com seleção dos 5 íons mais abundantes com cargas +2 ou +3 de cada espectro de massas para a análise ms/ms. Os parâmetros do espectrômetro de massas foram: voltagem capilar de 2,0 KV, temperatura capilar de 200°C, resolução de 100.000 e “FT target value” de 2×10^6 ions.

3.3.2.3 Processamento dos dados proteômicos e bioinformática

Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo “Computational Proteomics Analysis System – CPAS”, utilizando-se o algoritmo de busca X!. O critério de qualidade dos peptídeos identificados foi obtido pelo algoritmo Peptide Prophet. Somente peptídeos que atingiram uma taxa de erro inferior a 1% foram agrupados na sequência das proteínas utilizando-se o algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii *et al.*, 2003), que também resolve o problema de inferência de proteínas. Esta plataforma de análise de dados proteômicos é do tipo “*open source*” disponível publicamente e foi implantada em computador de alto desempenho no departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Para integração de dados, análise de bioinformática de vias regulatórias, interações proteína-proteína e “gene ontology” foi realizada utilizando o programa de domínio público *Funrich* (<http://www.funrich.org>).

3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para caracterizar o crescimento e o metabolismo celular durante os cultivos das MCUs em biorreatores foram consideradas as densidades máximas de células aderidas produzidas por mL de meio de cultura e parâmetros de cultivo como:

- velocidade específica máxima de crescimento celular, $\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1});

- rendimento aparente de lactato a partir da glicose, $Y_{lac/gli}$ (mM lactato/mM glicose);
- rendimento aparente de amônia a partir da glutamina, $Y_{amo/gln}$ (mM amônia/mM glutamina);
- velocidade específica de consumo de glicose, q_{gli} (pmol/cel.dia);
- velocidade específica de consumo de glutamina, q_{gln} (pmol/cel.dia)

Para estimativa da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) das MCUs nos biorreatores, utilizou-se a equação (2):

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

onde: μ (dia^{-1}) corresponde a taxa de crescimento específico em um determinado tempo

t - tempo de cultivo em dias

X - o valor de células viáveis de acordo com o tempo t.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) nos experimentos foi obtida através da tangente (α) do gráfico de $\ln(X-X_0)$ por tempo (dias).

A melhor maneira de caracterizar o metabolismo celular é através de suas velocidades de consumo e produção de metabólitos, ambas referidas a uma quantidade padrão de células (10^6 células). Mais conhecidos como coeficiente metabólicos, estes parâmetros facilitam a comparação de várias linhagens de células e diferentes condições de cultivo, além de possibilitar a identificação mudanças nos caminhos metabólicos em relação ao tempo e em resposta a alterações das condições de cultivo.

Os quocientes metabólicos (q_{Met} , pmol/(dia.cél)) foram calculados em cada intervalo de tempo utilizando a equação: $q_{Met} = \pm (\Delta_{met}/\Delta t \cdot \bar{Xv})$, onde Δ_{Met} é a variação da concentração do metabólito durante um período de tempo Δt e $\bar{Xv}$ é a média do número de células viáveis durante o mesmo período de tempo. O rendimento aparente de lactato a partir da glicose ($Y_{lactato/glicose}$) estima a fração de glicose que foi convertida a lactato pela glicólise, sendo calculado através

do quociente de $q_{\text{lact}}/q_{\text{gli}}$ determinado na fase de crescimento exponencial. O rendimento de amônia a partir da glutamina, $Y_{\text{amo/gln}}$ foi determinado de maneira semelhante ao $Y_{\text{lac/gli}}$, a partir da relação $q_{\text{amo}}/q_{\text{gln}}$.

Ao final dos experimentos, após a etapa de recuperação celular, as células foram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo e submetidas ao ensaio de capacidade de diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (DP) dos valores obtidos para diferentes doadores de células. Comparações entre os resultados experimentais foram realizadas por meio do teste t não-paramétrico. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Os dados experimentais utilizados para a confecção dos gráficos e cálculos dos diferentes parâmetros de cultivo obtidos em todos os experimentos realizados encontram-se apresentados nos Apêndices A e B (CD anexado no verso da contracapa). A lista de todas as proteínas secretadas pelas CMMs analisadas por espectrometria de massas está descrita no Apêndice C (CD).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Expansão das MCUs em frascos multicamadas

Nos experimentos realizados em frascos multicamadas inoculou-se 5000 células/cm² ou 1,5x10⁴ células/mL e após 6 dias de cultivo atingiu-se uma concentração máxima de células de 1,3 (±0,14) x10⁵ células/mL, representando um fator de expansão de 8,7(±0,90) vezes. Com a troca de 50% de meio de cultura no dia 3, não houve esgotamento de glicose e glutamina e formação de lactato e amônia em concentrações indesejáveis para as células (dados não mostrados). Após 6 dias de cultivo, a realização de dois ciclos de tripsinização possibilitou a eficiente recuperação de 100% das células (ausência de células aderidas ao frasco após a tripsinização observada em microscópio ótico invertido).

Os resultados de citometria de fluxo indicaram que não houve mudança significativa em nenhum dos marcadores de superfície antes e após a expansão das MCUs nos frascos multicamadas (Figura 11).

Figura 11 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs em frascos multicamadas. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.2 Expansão das MCUs nos diferentes tipos de biorreatores

4.2.1 Biorreator de leito fixo (Fibrastage®)

4.2.1.1 Crescimento Celular

Com uma densidade inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL (5000 células/cm²), MCUs foram inoculadas no sistema de cultura de leito fixo (FibraStage®), utilizando meio α -MEM suplementado com 10% de SFB (vol./ vol.). Durante a fase de adesão, analisou-se a quantidade de células presentes no sobrenadante para avaliar a taxa de adesão nos discos, a cada duas horas, como mostra a Figura 12. Podemos verificar que após 4 horas de cultivo, 95,8% das células já não se encontravam mais em suspensão, indicando adesão das células aos discos.

Figura 12 - Concentração de células em suspensão durante a fase de adesão celular realizada no biorreator de leito fixo com inóculo inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 500 mL e meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB à 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

O crescimento das MCUs nos discos Fibra-Cel foi monitorado através do ensaio de MTT durante o cultivo (n=3, três diferentes doadores) (Figura 13). Observou-se um crescimento celular intenso ($\mu_{\max} = 0,21 \text{ d}^{-1}$, $r^2 = 0,985$), sem a

comumente fase lag (~24 h) observada em cultivos com microcarregadores (Frauenschu *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2012). As viabilidades celulares permaneceram acima de 95% e o pH manteve-se na faixa ótima (7,2-7,4) durante todo o cultivo (Figura 13). O total de células na suspensão foi menor que 10% das células totais aderidas, comprovando que uma quantidade pequena de células se soltaram dos discos. No dia 7, a densidade celular máxima quantificada foi de $8,3 (\pm 1,6) \times 10^5$ células/mL, o que corresponde a um fator de expansão de $6,9 (\pm 1,3)$ (Figura 13).

Figura 13 – Perfil de crescimento das MCUs (A), evolução do pH (B) e fator de expansão (C) durante o cultivo no biorreator de leito fixo com inóculo inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 500 mL e meio de cultura α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, a 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão. As setas TM indicam troca de 50% do meio de cultivo.

A morfologia das MCUs durante a proliferação foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observou-se um aumento gradual da quantidade de células nos discos de Fibra-Cel ao longo do cultivo (Figura 14).

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das MCUs aderidas nos discos de Fibra-Cel durante os dias 3 (A e D), 5 (B e E) e 7 (C e F) de cultivo em biorreator de leito fixo com magnificação de 150x (A, B e C) e 300x (D, E e F).

4.2.1.2 Metabolismo celular

A fim de evitar limitações metabólicas, o regime de alimentação dos cultivos consistiu na remoção de 50% do meio de cultura a cada dia após o 5º dia e substituição com meio de cultura fresco. A concentração de nutrientes chave (glicose e glutamina) e subprodutos tóxicos (lactato e amônia) no sobrenadante foi mensurada ao longo dos cultivos (Figura 15). Durante todo o período, as concentrações de glicose e glutamina não diminuíram abaixo 0,26 e 0,08 mM, respectivamente (Figuras 15A, B). Como resultado do consumo da

glicose e glutamina, lactato e amônia foram produzidos, atingindo uma concentração máxima de 10,4 e 1,3 mM no 5º dia, respectivamente.

Figura 15 - Perfil de consumo de glutamina e glicose e produção de amônia e ácido láctico durante os cultivos das MCUs em biorreator de leito fixo, com inóculo inicial de $1,2 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 500 mL e meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. **(A)** Glicose e Lactato e **(B)** Glutamina e Amônia. As setas TM indicam troca de 50% do meio de cultura. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

A Tabela 6 apresenta os parâmetros metabólicos, taxas de consumo específicos de glicose (q_{gli}) e glutamina (q_{gln}); taxas de produção de lactato (q_{lac}) e amônia (q_{amo}) e rendimento específico aparente de lactato a partir de glicose ($Y_{lact/gli}$), estimados durante a fase de crescimento exponencial.

Tabela 6 - Parâmetros metabólicos estimados para expansão das MCUs em biorreator de leito fixo.

Parâmetro	Valor (média $\pm$ DP)
q_{gli} (pmol/cél.dia)	$2,90 \pm 0,32$
q_{lact} (pmol/cél.dia)	$3,16 \pm 0,22$
q_{gln} (pmol/cél.dia)	$0,14 \pm 0,43$
q_{amo} (pmol/cél.dia)	$0,40 \pm 0,16$
$Y_{lac/gli}$ (mmol/mmol)	$1,09 \pm 0,020$
$Y_{amo/gln}$ (mmol/mmol)	$2,85 \pm 0,37$

4.2.1.3 Recuperação celular

Apesar do elevado nível de expansão e mesmo com a utilização da Tryple[®] 10x mais concentrada, no final do cultivo foi possível apenas a recuperação de 18% ($\pm 0,77$) das células. Foi observado que mesmo após dois ciclos de tratamento com a enzima Tryple[®] 10x, a maioria das células permaneceu aderida aos discos de Fibras-Cel.

4.2.1.4 Propriedades biológicas pós-cultivo

As MCUs recuperadas dos experimentos em biorreator de leito fixo foram induzidas à diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos, como ilustra a Figura 16.

Figura 16 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em biorreator de leito fixo observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos **(A)**, 28 dias para osteócitos **(B)** e 14 dias para condrócitos **(C)**.

Como podemos observar na Figura 16A, gotículas de gordura que se tornaram evidentes a partir do 21º dia (coloração Sudan-II Scarlate). Já na Figura 16B o acúmulo de depósito de cálcio confirmou a diferenciação em osteócitos no 28º dia e na Figura 16C, a formação de proteoglicanos corados em azul confirmou a diferenciação em condrócitos com 14 dias.

A análise imunofenotípica das células expandidas mostrou que as mesmas foram positivas para vários marcadores comuns a CMMs e, como esperado, não houve diferença significativa na percentagem de células positivas observada antes e depois da expansão das células no biorreator de leito fixo ($P > 0,05$ – teste t não-pareado com correção de Welch), como ilustra a Figura 17.

Figura 17 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs em biorreator de leito fixo. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.2.2 Biorreator de tanque agitado (Celligen 310[®])

4.2.2.1 Seleção do microcarregador em frascos spinner

Realizaram-se experimentos em frasco *spinner* (100mL, com volume de trabalho de 50mL) com três diferentes microcarregadores: Cultispher-S, Cytodex 1 e Cytodex 3 para avaliar o melhor microcarregador tanto para expansão das MCUs quanto em termos de recuperação celular para posterior cultivo em biorreator tanque agitado.

Nos experimentos, utilizou-se um inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL e meio α -MEM suplementado com 10% de SFB (vol./vol.). A fase para a adesão teve duração de 5 horas e a agitação foi realizada de forma intermitente, sendo de 40 rpm por 30 segundos a cada 30 minutos. O objetivo de manter a agitação intermitente foi para aumentar o contato entre as células e os microcarregadores visando facilitar o processo de adesão. Durante a fase de adesão foram retiradas amostras do sobrenadante a cada uma hora para avaliar a progressão da adesão celular, estimada em função do desaparecimento das células em suspensão (Figura 18).

Figura 18 - Concentração de células (cél/mL) em suspensão durante a fase de adesão celular observada nos cultivos realizados em frasco *spinner* utilizando os microcarregadores Cytodex 1 (3,0 g/L), Cytodex 3 (3,0 g/L) e Cultispher-S (2,0 g/L), inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 50 mL, meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C.

Em apenas 2 horas, 84%, 98% e 94% das células já não se encontravam em suspensão nos cultivos realizados com os microcarregadores Cultispher-S, Cytodex 1 e Cytodex 3, respectivamente. A alta taxa de adesão celular no microcarregador Cytodex 1 já nas primeiras horas se deve à sua carga positiva, que atraiu as células (carga parcial líquida negativa) por forças eletrostáticas. Ademais, 5 horas de fase de adesão demonstraram ter sido suficientes para adesão da maioria das células nos diferentes microcarregadores.

Após a fase de adesão, a agitação foi mantida constante em 50 rpm, temperatura 37°C e 5% de CO₂. Observou-se que o número de células livres na suspensão permaneceu baixo durante os experimentos, deixando claro que as células não se soltaram dos microcarregadores e o pH manteve-se na faixa ótima de 7,2-7,4. Avaliou-se o crescimento celular nos três microcarregadores pela quantidade de células aderidas através do método enzimático MTT. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos ao longo do cultivo (7 dias).

Figura 19 - Perfil de crescimento das MCUs ao longo de 7 dias de cultivo em frasco *spinner* utilizando os microcarregadores Cytodex 1 (3,0 g/L), Cytodex 3 (3,0 g/L) e Cultispher-S (2,0 g/L), inóculo inicial de $1,25 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 50 mL, meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C.

No cultivo com o microcarregador Cultispher-S, os resultados do número de células obtidos pelo método do MTT mostraram uma fase lag nas primeiras 24 horas e posterior crescimento celular até o 6º dia, sendo que a densidade celular máxima quantificada foi de $8,5 \times 10^5$ células/mL. Adotando como medida de eficiência do cultivo o fator de expansão celular, pode-se dizer que esse experimento atingiu um fator de 6,8. A queda no número de células após o 6º dia pode ser devido à formação de aglomerado de microcarregadores e células.

Os cultivos com os microcarregadores Cytodex 1 e Cytodex 3 foram semelhantes, sendo que não foi observado crescimento celular significativo. Após esse período, as células não proliferaram como esperado, sendo que em 7 dias, a densidade celular máxima quantificada foi de $4,5 \times 10^5$ e $3,9 \times 10^5$ células/mL nos microcarregadores Cytodex 1 e Cytodex 3, respectivamente. O fator de expansão atingido foi de 3,6 e 3,1, respectivamente.

No final do cultivo, as células foram tripsinizadas dos microcarregadores utilizando a enzima Tryple 10x e foi possível observar uma taxa de recuperação de 70%, 22% e 6% nos microcarregadores Cultispher S, Cytodex 3 e Cytodex-1.

Imagens do crescimento celular nos três microcarregadores Cultispher-S, Cytodex 1 e Cytodex 3 foram obtidas durante os experimentos através de microscopia ótica ao longo do cultivo (7 dias). As células foram coradas com o reagente MTT (cor púrpura) para melhor visualização (Figura 20). Observou-se um aumento gradativo no número de células aderidas aos microcarregadores com o passar do tempo. No microcarregador Cultispher-S, observou-se a formação intensa de aglomerados de microcarregadores e células, fato problemático, uma vez que dificulta a quantificação celular e morte celular, pois as células que ficam no interior dos aglomerados não recebem adequada oxigenação e nutrientes.

- Cultispher-S

- Cytodex 1

- Cytodex 3

Figura 20 - Microscopia ótica das CMMs aderidas aos microcarregadores Cultispher S, Cytodex 1 e Cytodex 3 durante o cultivo em frascos *spinner*. Magnificação 10x.

4.2.2.2 Biorreator de tanque agitado com microcarregador Cultispher-S

4.2.2.2.1 Crescimento celular

Os experimentos em frasco *spinner* mostraram que o Cultispher-S foi o melhor em relação ao crescimento e recuperação celular. Assim, esse microcarregador foi utilizado para o cultivo no biorreator de tanque agitado. No início do experimento, adicionou-se 700 mL de α -MEM 10% SFB (vol./vol.) com 2,0 g/L do microcarregador Cultispher-S no biorreator e estabeleceu-se os parâmetros de cultivo pH = 7,30; DO = 20% e T = 37°C. Assim, inoculou-se o biorreator com $7,5 \times 10^4$ cel/mL, sendo o volume de trabalho completado para 800 mL. O elevado volume de meio de cultura utilizado no experimento (800 mL) impôs limitações relacionadas à densidade celular inicial. Em função da grande quantidade de células requeridas para manter a passagem estabelecida (5ª passagem) e de frascos T não foi possível manter o mesmo inóculo utilizado no experimento em frasco *spinner* ($1,25 \times 10^5$ cél/mL). A fase de adesão (agitação intermitente, 30 em 30 minutos por 30 segundos, 40 rpm) teve duração de 6 horas e monitorou-se a concentração de células em suspensão a cada duas horas (Figura 21). Ao final deste período, 92,2 ($\pm 5,1$)% das células inoculadas se encontravam aderidas aos microcarregadores.

Figura 21 - Concentração de células (cél/mL) em suspensão durante a fase de adesão celular realizada no biorreator de tanque agitado, inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

O gráfico a seguir ilustra o crescimento celular e fator de expansão obtido nos experimentos (Figura 22).

Figura 22 - Perfil de crescimento das MCUs **(A)** e fator de expansão **(B)** em 7 dias de cultivo no biorreator tanque agitado, com inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

Analisando a Figura 22, observa-se que o número de células na suspensão permaneceu baixo e aproximadamente constante ao longo do cultivo. Houve um intenso crescimento celular ($\mu_{\max} = 0,70 \text{ d}^{-1}$, $r^2 = 0,999$) e a produção celular máxima foi de $6,6 (\pm 0,29) \times 10^5$ células/mL ($n=3$, três diferentes doadores) em 7 dias, sendo o fator de expansão celular máximo de $8,8 (\pm 0,39)$. O pH manteve-se no valor de 7,30 durante todo o cultivo.

A morfologia das MCUs durante o crescimento celular foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observou-se um aumento gradual de células nos microcarregadores durante os dias 3, 5 e 7 e uma intensa formação de aglomerado de microcarregadores e células a partir do 5º dia de cultivo (Figura 23).

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das MCUs aderidas no microcarregador Cultispher-S durante os dias 3 (A, D e G), 5 (B, E e H) e 7 (C, F e I) de cultivo no biorreator de tanque agitado. Magnificação de 100x (A, B e C); 200x (D, E e F) e 500x (G, H e I).

4.2.2.2.2 Metabolismo celular

Observou-se um gradual consumo dos substratos glicose e glutamina, atingindo valores mínimos de 0,24 e 0,94 mM no dia 7, respectivamente, não havendo esgotamento em função das trocas de meio realizadas. Devido à alta atividade glicolítica das células ($Y_{lac/gli} = 1,45$), no final do cultivo, a concentração de lactato atingiu um valor de 10,48 mM. Em relação à produção de amônia, atingiu-se o valor máximo de 0,77 mM no dia 7 (Figura 24).

Figura 24 - Perfil de consumo de glutamina e glicose e produção de amônia e ácido láctico durante os cultivos das MCUs em biorreator de tanque agitado, com inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL e meio α -MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 37°C. **(A)** Glicose e Lactato e **(B)** Glutamina e Amônia. As setas TM indicam troca de 50% do meio de cultura. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

Os quocientes metabólicos calculados indicam um alto consumo de glicose ($q_{gli} = 5,31 \pm 3,2$ pmol/cél.dia) quando comparado com o consumo de glutamina ($q_{gln} = 1,01 \pm 0,9$ pmol/cél.dia). A Tabela 7 apresenta os valores estimados para os parâmetros metabólicos q_{gli} , q_{gln} , q_{lact} , q_{amo} e $Y_{lac/gli}$.

Tabela 7- Parâmetros metabólicos estimados para expansão das MCUs em biorreator de tanque agitado.

Parâmetro	Valor (média $\pm$ DP)
q_{gli} (pmol/cél.dia)	$5,3 \pm 3,2$
q_{lact} (pmol/cél.dia)	$6,3 \pm 2,8$
q_{gln} (pmol/cél.dia)	$1,0 \pm 0,9$
q_{amo} (pmol/cél.dia)	$0,4 \pm 0,2$
$Y_{lac/gli}$ (mmol/mmol)	$1,45 \pm 1,79$
$Y_{amo/gln}$ (mmol/mmol)	$0,6 \pm 0,634$

4.2.2.2.3 Recuperação celular

A recuperação celular foi mais efetiva nesse experimento devido à adoção da estratégia de divisão do conteúdo (microcarregadores + células) em dois *spinners* sob agitação (100 rpm por 20 minutos), com 2 ciclos repetidos de ação da Tryple® 10x. Esse procedimento fez com que o microcarregador se dissolvesse mais facilmente, facilitando a recuperação das células. A recuperação celular foi de 61% ($\pm 15,7$) ($n=3$).

4.2.2.2.4 Propriedades biológicas pós-cultivo

As MCUs recuperadas dos experimentos em biorreator de tanque agitado foram capazes de se diferenciar em osteócitos, adipócitos e condrócitos após o cultivo, como ilustra a Figura 25.

Figura 25 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em biorreator de tanque agitado observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos **(A)**, 28 dias para osteócitos **(B)** e 14 dias para condrócitos **(C)**.

A diferenciação em adipócitos começou a ser evidenciada morfolologicamente por volta do 10º dia de indução, quando as gotículas de gordura começaram a surgir, aumentando de número e tamanho com o passar dos dias (Figura 25A). A diferenciação em osteócitos se tornou evidente por volta de 15 dias após o início do cultivo em meio indutor. O acúmulo de depósito de cálcio confirmou a diferenciação em osteócitos no 28º dia. Como observa-se na Figura 25C a formação de proteoglicanos corados em azul confirmou a diferenciação em condrócitos com 14 dias.

Os resultados da análise imunofenotípica revelaram que as células expandidas foram positivas para vários marcadores comuns a CMMs e, como esperado, não houve diferença significativa na percentagem de células positivas observada antes e depois da expansão das células no biorreator tanque agitado ($P > 0,05$ - teste t não-pareado com correção de Welch), como ilustra a Figura 26.

Figura 26 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs em biorreator de tanque agitado. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três doadores diferentes). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.2.3 Biorreator de fibra-oca (Quantum® expansion system)

4.2.3.1 Crescimento celular

No primeiro experimento, inoculou-se 60×10^6 células (aprox. 3000 células/cm²) no espaço intracapilar (EIC) do biorreator com um volume de 100 mL de meio de cultura. Foi realizada amostragem diária de meio de cultura do EIC. Como a amostragem da biomassa nesse biorreator é extremamente difícil, o crescimento celular foi estimado indiretamente a partir do consumo da glicose e produção de lactato no decorrer do experimento. A Figura 27A ilustra o consumo de glicose e produção de lactato durante todo o experimento.

Como mencionado anteriormente, o regime de alimentação do biorreator baseia-se na perfusão, sendo que o meio de cultura fresco é continuamente recirculado no EIC a uma vazão pré-determinada. Sendo assim, nos três primeiros dias de cultivo, a vazão utilizada no EIC foi de 0,1 mL/min e foi possível observar um consumo acentuado de glicose e produção de lactato. A partir do dia 3, aumentou-se a vazão para 0,2 mL/min e assim sucessivamente, de modo que não houvesse esgotamento da glicose e geração de lactato em concentrações inibitórias para o crescimento celular. A Figura 27B apresentada a seguir ilustra o aumento da vazão do EIC utilizado no experimento.

Figura 27 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de lactato; **(B)** Vazão no EIC e **(C)** Taxa de consumo de glicose e produção de lactato no experimento 1 no biorreator de fibra-oça, inóculo inicial de 60×10^6 células, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes a um experimento individual.

Quando se observou que a taxa de consumo de glicose e produção de lactato permaneceram constantes (entre os dias 5 e 6) (Figura 27C), indicando possível diminuição ou parada de crescimento celular, finalizou-se o experimento. Assim, realizou-se a recuperação celular através de 2 ciclos sucessivos de tratamento com a enzima tripsina por 8 minutos cada. Após o procedimento, as células em suspensão foram coletadas, transferidas para tubos falcon de 50 mL, centrifugadas e ressuspensas em um volume determinado para contagem celular. O valor de células quantificado ao fim do procedimento foi de 90×10^6 células totais, o que resulta em um fator de expansão de aproximadamente 1,5 vezes. Este valor se encontra subestimado devido à dificuldade de recuperação das células atribuída a elevada confluência das células com intensa formação de matriz extracelular no interior do biorreator, o que fez com que muitas células ficassem aprisionadas no biorreator formando agregados celulares, como pode-se observar pela Figura 28.

Figura 28 - Imagem das células retidas no cartucho após o procedimento de recuperação celular no biorreator de fibra-oca.

Para otimizar o crescimento e a recuperação celular no biorreator de fibra-oca, realizaram-se experimentos adicionais ($n=2$, dois doadores diferentes) utilizando-se um inóculo menor (21×10^6 células, $1000 \text{ células/cm}^2$). O racional desse experimento foi evitar a confluência excessiva das células no interior do biorreator, diminuindo a formação de matriz extracelular, maximizando assim a recuperação celular. Dessa forma, monitorou-se o consumo de glicose e produção de lactato (amostragens diárias), sendo

aumentada a vazão da perfusão no EIC em função do consumo de glicose/produção de lactato, conforme o experimento anterior. Com isso, não houve esgotamento da glicose e formação de lactato em concentrações consideradas inibitórias para o crescimento celular. A Figura 29A apresentada a seguir ilustra o perfil metabólico das células e a vazão no EIC utilizada no experimento. Podemos observar que as taxas de consumo de glicose e produção de lactato (mmol/cél/dia) foram mais acentuadas que as obtidas no experimento anterior (Figura 29C), sugerindo maior crescimento celular.

Figura 29 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de lactato, **(B)** vazão no EIC e **(C)** Taxa de consumo de glicose e produção de lactato no biorreator de fibra-oca com inóculo inicial de 21×10^6 células, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 2 cultivos (dois doadores diferentes). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.2.3.2 Recuperação celular

Após 5 dias de cultivo, optou-se por finalizar o experimento para recuperar a maior quantidade possível de células, evitando a formação dos agregados celulares que dificultaram a recuperação celular no experimento anterior. Após dois ciclos de tripsinização, recuperou-se $205 (\pm 0,21) \times 10^6$ células totais, representando um fator de expansão celular de $9,8 (\pm 1,0)$ vezes. Considerou-se a recuperação de 100% das células, uma vez que após dois ciclos de tripsinização não houve aumento significativo da quantidade de células no último ciclo. Esse resultado foi considerado satisfatório, uma vez que obteve-se grande quantidade de células em um menor tempo de cultivo (5 dias).

4.2.3.3 Propriedades biológicas pós-cultivo

As MCUs recuperadas dos experimentos em biorreator de fibra-oca demonstraram capacidade de se diferenciar nas linhagens adipogênicas (Figura 30A), osteogênicas (Figura 30B) e condrogênicas (Figura 30C) após indução com meios de cultura específicos.

Com as células recuperadas, realizou-se também a citometria de fluxo para avaliação dos antígenos de superfície (Figura 31). Não houve diferenças significativas entre os marcadores de superfície pré e pós-cultivo em biorreator ($P > 0,05$ - teste t não-pareado com correção de Welch).

Figura 30 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em biorreator de fibra-oca observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (A), 28 dias para osteócitos (B) e 14 dias para condrócitos (C).

Figura 31 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs no biorreator de fibra-oça com inóculo inicial de 21×10^6 células, meio α - MEM suplementado com 10% de SFB, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 2 doadores diferentes. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.3 Comparação dos diferentes sistemas de cultivo avaliados

4.3.1 Comparação da expansão celular

Os resultados da expansão e recuperação celular dos diferentes sistemas de cultivos avaliados foram comparados com intuito de identificar o sistema mais adequado para a expansão das MCUs. A Figura 32A ilustra a quantidade de células inicial e final obtida em cada sistema de cultivo em função da área disponível (cm^2) para o crescimento, para uma melhor comparação. Como pode ser observado, partindo da mesma densidade inicial de células ($5000 \text{ células}/\text{cm}^2$), um nível similar de crescimento foi observado para os frascos multicamada (MC), biorreator de tanque agitado (TA) e leito fixo (LF), atingindo $4,3 (\pm 0,44) \times 10^4$, $4,4 (\pm 0,19) \times 10^4$ e $3,4 (\pm 0,67) \times 10^4$ células/ cm^2 , respectivamente. No biorreator de fibras-ocas (FO), uma densidade final de células de $9,8 (\pm 1,01) \times 10^3$ células/ cm^2 foi obtida, utilizando um inóculo inicial 5 vezes menor que os outros sistemas ($1000 \text{ células}/\text{cm}^2$). O

fator de expansão nos cultivos também foi levado em consideração, como pode-se observar na Figura 32B. O FO apresentou o maior fator de expansão ($9,8 \pm 1,0$) em 5 dias, seguido pelo TA, MC e LF ($8,8 \pm 0,39$, $8,7 \pm 0,90$, $6,9 \pm 1,3$, respectivamente).

Figura 32 - Expansão das MCUs nos diferentes sistemas de cultivo avaliados. **(A)** Densidade de células inicial e final. **(B)** Fator de expansão estimado em função da quantidade de células obtida no final do experimento e o número de células iniciais. MC-frascos multicamada, TA-biorreator de tanque agitado, LF-biorreator de leito fixo e FO-biorreator de fibras ocas.

Para facilitar a comparação entre os sistemas, estimou-se também o tempo de duplicação (TD, horas). O tempo de duplicação é um importante parâmetro que auxilia mensurar a adaptação da célula no sistema de cultivo de maneira indireta, de modo que quanto mais rápido as células dividem, mais metabolicamente ativas as células se encontram. Corroborando com os resultados dos fatores de expansão, as células no FO apresentaram a menor média do tempo de duplicação ($36,8 \pm 1,7$ horas), seguido pelo MC, TA e LF (Tabela 8).

Tabela 8 - Características de crescimento e recuperação celular das MCUs nos diferentes sistemas de cultivo avaliados. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores) para MC, TA e LF, e 2 cultivos (dois diferentes doadores) para FO.

Sistemas de cultivo	Densidade inicial de células (cel/cm ²)	Células recuperadas (célis/cm ²) (±DP)	Tempo duplicação (horas) (±DP)	Recuperação celular (%) (±DP)
MC	5000	$4,3 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^3$	$46,6 \pm 2,3$	100 ± 0
TA	5000	$2,7 \times 10^4 \pm 7,9 \times 10^3$	$53,8 \pm 1,1$	$61 \pm 15,7$
LF	5000	$6,1 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$	$61,5 \pm 6,3$	$18 \pm 0,77$
FO	1000	$9,8 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$36,8 \pm 1,7$	100 ± 0

4.3.2 Comparação dos custos da expansão (COG)

Os resultados da expansão das MCUs nos sistemas de cultivos anteriormente descritos (frascos multicamadas, biorreator de tanque agitado, leito fixo e fibras-ocas) foram utilizados para calcular e avaliar a viabilidade econômica de cada sistema visando produzir um número significativo de células em escala comercial para utilização no tratamento da DECH, uma possível complicação após o transplante de CTH. O ensaio clínico para esse tratamento está sendo realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo) em fase I/II. Para esse estudo, assumiu-se uma dose de 4×10^6 células/kg de paciente (peso médio mundial – 69kg), taxa de incidência de DECH de 30-60%, demanda máxima anual de 10000 pacientes e produção de 100 lotes por ano.

Uma vez que as MCUs têm um potencial de expansão limitado, o estudo do COG estimou, em primeiro lugar, o tamanho dos bancos de células exigidos para cada sistema de cultivo e os custos relacionados. Após isso, os custos de produção por dose em cada fase do processo de produção celular (banco de células, cultura das células, processo *downstream* e transporte) foram estimados. Além disso, foi possível a identificação dos fatores de custo-chave para cada etapa do processo e avaliação da rentabilidade dos diferentes sistemas em distintos cenários de reembolso.

4.3.2.1 Análise de custos do banco de células

De acordo com os resultados de crescimento e recuperação celular obtidos nos sistemas de cultivo avaliados, realizou-se uma previsão do número de doadores de cordão umbilical (Figura 33A) e consequentemente do tamanho do banco de células mestre (BCM) e de trabalho (BT) necessários para atingir a demanda de 10 000 doses por ano. A partir disso, calculou-se os custos associados para estabelecer o BCM e BT (Figura 33B). Assumiu-se que uma média de 3×10^6 CMMs são isoladas a partir de um único cordão umbilical (dados fornecidos pela equipe do Laboratório de Terapia Celular, Hemocentro de Ribeirão Preto).

Analisando a Figura 33A, observa-se que o biorreator de LF requer o maior número de doadores de cordão umbilical e, consequentemente, BCM, devido ao seu baixo rendimento na recuperação celular (~ 18%). O número de BCMs necessários para o biorreator LF satisfazer a demanda de 10 000 pacientes por ano excede o número máximo de 100 cordões umbilicais que um único grupo pode processar dentro desse mesmo período. Ambos os biorreatores FO e MC têm um rendimento de recuperação celular de 100% (isto é, 100% da densidade celular obtida no final do cultivo) e, por isso, exigem o menor número de doadores de cordão umbilical. O biorreator FO exige o menor número de BCMs, uma vez que as células crescem a uma taxa relativamente alta de proliferação (baixo tempo de duplicação). A Figura 33B mostra que os custos para o estabelecimento do banco de células seguem a mesma tendência observada na Fig. 33A, com LF tendo os custos mais elevados por dose, pelas razões acima mencionadas.

(A)

(B)

Figura 33 – (A) Distribuição do número de doadores necessários para produzir 10 000 doses por ano e **(B)** Distribuição dos custos para estabelecimento de BCM e BT por dose nos diferentes sistemas de cultivos avaliados para uma demanda de 10 000 pacientes por ano.

4.3.2.2 Estudo da viabilidade econômica dos sistemas de cultivo avaliados

Realizou-se um estudo para avaliar a contribuição de cada fase do processo de produção celular (banco de células, cultura das células, processo downstream e transporte) no custo total dos sistemas de cultivo avaliados. A Figura 34 mostra o COG/dose e COG/milhão de células em cada um dos

sistemas por cada etapa do processo. Fica evidente que o sistema MC apresenta o melhor custo-benefício e maior robustez (menor desvio padrão), com um COG/dose de US\$ 4.528, seguido do TA com um COG/dose de US\$ 6.460. Vale ressaltar que o biorreator TA possui uma alta variabilidade no COG/dose, devido ao elevado desvio padrão na taxa de recuperação celular (Tabela 8). O sistema LF se mostra mais robusto do que TA devido ao menor desvio padrão na taxa de recuperação de células; no entanto têm maior média COG/dose (US\$ 12.591). O elevado COG/dose no LF pode ser atribuído principalmente à sua baixa taxa de recuperação celular. A Tabela 9 apresenta as principais características operacionais e custos utilizados para análise do COG. Biorreatores FO possuem a maior média COG/dose (US\$ 65.143) em função do maior custo do equipamento (55 vezes maior do que MC). Além disso, a baixa densidade celular final (9800 células/cm²) faz com que sejam necessários múltiplos biorreatores para produzir um único lote.

A Figura 34 também mostra que a fase do processo com os custos mais elevados é a fase da cultura de células acompanhada pelo banco de células e das etapas DSP (*downstream process*).

Figura 34 – COG por etapa do processo. As barras de erro mostram o mínimo e máximo COG/dose total e COG / milhão de células. Os parâmetros que variaram nesta análise foram: número inicial de células por banco de células, o tempo de duplicação, taxa de recuperação celular, o peso do paciente e a taxa de falhas do lote.

Tabela 9 - Características operacionais e custos dos diferentes sistemas de cultivo avaliados levadas em consideração na ferramenta econômica para análise do COG. MC-frascos multicamadas, TA-biorreator de tanque agitado com microcarregadores, LF-biorreator de leito fixo, FO-biorreator de fibras-ocas.

Processo	Classe	Parâmetro	Valor				Unidade
Expansão celular	Atributos	Nome tecnologia	MC-36	TA 500	LF500	FO	-
		Área superficial	122 400	3 750 000	500 000	21 000	cm ² /unidade
		Volume de meio	0,2	0,05	0,083	0,2	mL/cm ²
		Nr de biorreatores/ frascos utilizados	55	1	15	207	-
		Capacidade incubadora	12	-	-	-	Biorreatores, frascos/ Unidade
		Duração cultura	6	7	7	5	Dias
		Duração início cultura	1,3	3	1	0,17	h
		Duração troca de meio	0,67	1,5	0,5	0	h
		Duração recuperação final	0,67	1,5	0,5	0,2	h
		Número de operadores	6	3	3	26	Operadores
	Custos	Consumíveis	$5,8 \times 10^{-2}$	$0,19 \times 10^{-2}$	$5,6 \times 10^{-2}$	$57,1 \times 10^{-2}$	US\$/cm ²
		Incubadora	17 835	-	-	-	US\$/unidade
		Equipamento	-	198 847	300 000	150 000	US\$/unidade
Processo DSP	Atributos	Rendimento	68	61.2	68	68	%
		Tempo	1,15	3,67	1,26	2,23	h

MC: frascos multicamadas (ex. Hyperstack®, Corning), TA: biorreator tanque agitado com microcarregadores (ex. BIOSTAT®, Sartorius), LF: leito fixo (ex. icellis, Pall Life sciences), FO: biorreator fibra-oca (e.g. Quantum®, Terumo BCT).

4.3.2.3 Principais fatores relacionados aos custos

A Figura 35 ilustra os diferentes fatores relacionados ao custo por processo nos diferentes sistemas de cultivo testados. Na etapa de estabelecimento do banco de células, a maioria dos sistemas de cultivo segue a mesma tendência, com os custos de depreciação dos equipamentos sendo o principal fator determinante. Este fato ocorre, pois esta etapa envolve a utilização de frascos multicamadas de 40 andares (CS40), com manipuladores

automatizados custando \$ 425 000 cada. Por outro lado, o sistema LF (Figura 35C) segue um padrão diferente, sendo que os custos-chave na etapa do banco de células se referem aos custos de reagentes, nomeadamente os custos de meio de cultura. Isso decorre do fato de que é necessária uma maior quantidade de doadores de cordão umbilical por ano (aprox. 68 doadores) e de um maior BCM, fazendo com que a quantidade de reagentes e consumíveis também seja elevada, impactando de maneira negativa no COG. Uma tendência similar é observada no biorreator TA (Figura 35B), já que esta tecnologia exige 18 doadores de cordão umbilical por ano, valor maior do que em MC e FO (10 e 9, respectivamente). A etapa de cultura de células é a que mais difere entre as tecnologias. Para MC, os principais fatores de custo são os reagentes, materiais de consumo e de mão-de-obra. Estes frascos de cultura de células não são automatizados e, portanto, dependem de operação manual (custo de mão-de-obra tem um impacto maior sobre o COG do que os custos de depreciação). O biorreator TA (Figura 35B) tem o menor custo de consumíveis/cm² dentre os sistemas de cultivo avaliados (Tabela 9), pois embora os custos do equipamento sejam elevados, é necessário apenas um biorreator por lote e, portanto, os custos de depreciação estão diluídos ao longo de um elevado número de células. Este biorreator é totalmente automatizado e, portanto, os custos de mão-de-obra são relativamente baixos. O biorreator FO (Figura 35D) também é automatizado, porém, os fatores-chave para os custos incluem o elevado custo de depreciação e de consumíveis/cm². A maioria sistemas de cultivo seguem a mesma tendência nos custos do processamento *downstream* (DSP), com os custos de depreciação sendo o principal fator. Os sistemas Ksep[®] comumente utilizados nesta etapa possuem custo elevado (até US\$ 500.000). Os sistemas Ksep[®] são centrífugas descartáveis utilizadas para recuperação celular. Nos biorreatores FO, as tendências são um pouco diferentes, porque os mesmos operadores realizam a recuperação celular e DSP em um tempo relativamente curto (6,4 h na sala limpa). Assim, como o FO possui a tecnologia mais automatizada, o número de manipulações necessárias durante a cultura de células é mínimo, exigindo menor tempo de trabalho dos operadores.

Os custos relacionados ao transporte são compostos por duas categorias: custos de mão-de-obra e de transporte. Uma vez que uma equipe de 3 operadores podem processar o envio de 10 000 doses, os custos de mão-de-obra por dose são bem pequenos, com a maior parte dos custos atribuídos ao transporte.

Figura 35 - Contribuição percentual para o COG/dose dos diversos fatores considerados (reagentes, consumíveis, depreciação, mão-de-obra, controle de qualidade e transporte) na análise de custo nos diferentes sistemas de cultivo avaliados. (A) MC, (B) TA, (C) LF e (D) FO.

4.3.2.4 Análises de Reembolso

A Figura 36 mostra a variação percentual no COG necessário para as diferentes tecnologias alcançarem uma margem de lucro bruta de 85%, sob diferentes cenários de reembolso. Cenários com um percentual positivo

correspondem a situações em que nenhuma melhoria é necessária para cumprir esse objetivo. Cenários negativos mostram a redução percentual de COG necessária para que as tecnologias se tornem competitivas considerando um determinado preço de venda.

As três estratégias de reembolso selecionadas foram: NICE (National Institute for Health and Care Excellence), empresa Mesoblast para o produto TEMCEL[®] (CMMs alogênicas para tratamento da DECH) e empresa NuVasive para o produto Osteocel[®] (tratamento alogênico de enxerto ósseo utilizando CMMs). O preço de venda destes produtos são US\$ 40.000/dose, US\$ 98/10⁶ células, US\$12.958/10⁶ células, respectivamente (www.nice.org.uk; <http://globenewswire.com>; www.acesurgical.com). Os preços utilizados para os produtos TEMCEL[®] e Osteocel[®] foram adaptados ao tamanho da dose utilizado neste trabalho (4x10⁶ células/kg e 68,6 kg), tornando-se US\$ 26.911/dose e US\$3.558 267/dose.

Os resultados mostram que, sob o reembolso aplicado a TEMCEL[®], nenhuma tecnologia irá atingir uma margem bruta de 85%. Isso ocorre porque apesar do tamanho da dose para esta terapia ser maior do que o utilizado no estudo clínico descrito neste trabalho (8 × 2x10⁶ células/kg), provavelmente o sistema de cultivo utilizado no sistema de produção da TEMCEL permite maior produção e recuperação celular, tornando o processo mais rentável. Além disso, se essa elevada dose for capaz de atingir uma maior demanda, o COG/milhão de células será menor, pois o COG total diminui com o aumento da demanda (Chilima *et al.*, 2015). Ao considerar o reembolso da NICE, apenas o biorreator MC produziria uma margem bruta de 85%, nos permitindo aumentar o preço de venda e aumentar os lucros. No cenário Osteocel[®], a maioria das tecnologias alcançariam margens brutas satisfatórias com exceção do biorreator FO.

Mesmo considerando o pior cenário de reembolso TEMCEL[®], (nenhum sistema de cultivo atinge a margem bruta de 85%) analisando os principais fatores responsáveis pelo COG (Figura 35), é possível fazer alterações no processo para alcançar um COG satisfatório. No caso de MC e TA, o principal fator responsável pelo COG é o custo de meio de cultura. Uma redução de 30% (US\$ 315/L) e 67% (US\$ 148,5/L) nos custos de meio (obtidos através de

descontos na compra em grandes quantidades ou preparação *in-house*) resultaria em margens brutas satisfatórias para a MC e TA respectivamente. Os principais fatores de custo em LF são os consumíveis e meio de cultura. A Figura 36 mostra que é necessária uma redução de 68% no COG e, para isto ocorrer, mudanças drásticas de processo são necessárias a fim de atingir este objetivo. Estas mudanças incluem: aumento da eficiência de recuperação celular para 60%, diminuição dos custos de meio de cultura em 77% (US\$ 103,5/L), redução de 90% dos custos do biorreator/cm² (US\$ 0,13x10⁻¹²/cm²) e os custos de equipamento para 90% (US\$ 30 000/unidade). No FO, os custos-chave são consumíveis e custos de depreciação. Para que este biorreator seja competitivo comparado com as outras tecnologias, no cenário de reembolso considerado neste trabalho, um aumento dramático na densidade de células obtidas seria necessário (70 000 células/cm²), bem como uma redução de 80% nos custos com consumíveis e os custos do equipamento (para US\$ 0,11/ cm² e US\$ 30 000 por unidade, respectivamente). Além disso, uma redução de 50% nos custos de meio de cultura também seria necessária (US\$ 225/L).

Figura 36 - Aumento/redução na porcentagem no COG/dose necessário para atingir 85% da margem de lucro bruta nos diferentes sistemas de cultivo avaliados considerando o cenário de reembolso NICE e de outros dois produtos baseados em CMMs (TEMCEL e OsteoCel).

4.4 Expansão das MCUs em condições livres de SFB e xenoantígenos em biorreator tanque agitado

Analisando de maneira conjunta os dados experimentais obtidos, a análise dos custos dos diferentes sistemas de cultivo, a escalonabilidade de cada sistema, bem como adequação com as normas BPM, o biorreator de tanque agitado foi escolhido como o sistema de cultivo mais adequado. Apesar de ser menos eficiente do que o FO na expansão celular e possuir custo superior ao MC, o mesmo possui uma boa escalonabilidade, e é compatível com processamento automatizado e com as normas exigidas pelas agências regulatórias. Dessa forma, este foi o sistema escolhido para a etapa subsequente deste trabalho que envolveu o estabelecimento de um processo de expansão isento de SFB e de xenoantígenos.

4.4.1 Expansão das MCUs em condições livres de SFB

Primeiramente buscou-se o estabelecimento de condições isentas de xenoantígenos e SFB baseando-se em formulações comerciais. Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Claudia Lobato e Prof. Dr. Joaquim Cabral do laboratório de pesquisa *Stem Cell Bioengineering & Regenerative Medicine* da Universidade de Lisboa (Portugal) através de doutorado sanduíche (BEPE/Fapesp).

Inicialmente foram testados diversos microcarregadores de plástico (Synthemax, Cellbind (ambos da Corning, EUA)) e diversas formulações comerciais (Stempro MSC, Xuri MSC (GE Healthcare, EUA)) para o estabelecimento do processo livre de xenoantígenos. Porém, não foi possível obter um crescimento celular satisfatório com o protocolo já estabelecido pelo grupo de pesquisa (dados não mostrados). Dessa forma, optou-se por utilizar o microcarregador Cultispher-S já utilizado de maneira satisfatória no presente trabalho e bem consolidado na literatura para expansão de CMMs. Realizaram-se experimentos iniciais em frasco *spinner* e as condições estabelecidas foram implementadas no biorreator de tanque agitado.

4.4.1.1 Frasco spinner

Com um inóculo de 1×10^5 células/mL e 1 g/L do microcarregador Cultispher-S revestido com CELLStart, foi possível uma adesão inicial de 90% ($\pm 0,23$) após 24 horas de agitação constante ($n=4$, quatro doadores diferentes). As células apresentaram uma taxa específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\max}$) de $0,91 \text{ d}^{-1}$ ($r^2 = 0,96$), atingindo uma densidade celular máxima de $2,4$ ($\pm 1,1$) $\times 10^5$ células/mL no dia 5, correspondendo a um fator de expansão de 5,3 ($\pm 1,6$) (valor determinado considerando o número de células aderidas aos microcarregadores após 24 horas). Se considerada a quantidade de células inoculadas, conforme realizado nos experimentos anteriores, o fator de expansão esperado seria de 4,9 ($\pm 1,9$). A viabilidade manteve-se acima de 95% durante todo o cultivo (Figura 37).

Figura 37 - Perfil de crescimento e viabilidade das MCUs em 6 dias de cultivo em frasco *spinner*, com inóculo inicial de 1×10^5 células/mL, microcarregador Cultispher-S (1 g/L), volume de trabalho de 80 mL e meio de cultura StemPRO® CMMs SFM, a 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 4 cultivos de MCUs (quatro diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

Meio de cultura foi adicionado (20 mL nos dias 2 e 4) para reposição de nutrientes e fatores de crescimento e diluição de subprodutos tóxicos. Utilizando essa estratégia de alimentação, não houve exaustão de glicose

(Figura 38A) e as células apresentaram um elevado consumo específico $11 \pm 5,1$ (pmol/cel.dia) durante os três primeiros dias (Figura 38B). A produção de lactato atingiu um valor máximo de $5,6 \pm 1,9$ mM, com uma produção específica de $8,9 \pm 4,6$ (pmol/cel.dia) (Fig 38B). O rendimento aparente de lactato a partir da glicose ($Y_{lac/glic}$) foi de $1,6 (\pm 0,46)$ durante todo o cultivo.

Figura 38 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de ácido láctico e **(B)** taxa específica de consumo de glicose/produção de lactato durante os cultivos das MCUs em frasco *spinner* com inóculo inicial de $1,0 \times 10^5$ células/mL, volume de trabalho de 80 mL, meio de cultura StemPRO® MSC SFM, a 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 4 cultivos de MCUs (quatro diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.4.1.2 Biorreator de tanque agitado

Após a padronização e verificação das melhores condições para o cultivo das MCUs em condições agitadas (frasco *spinner*), realizou-se a implementação dessa cultura em biorreator de tanque agitado (800 mL de volume de trabalho) ($n=3$, três diferentes doadores). Novamente utilizou-se um inóculo menor que o frasco *spinner* pelas razões citadas anteriormente no cultivo em biorreator de tanque agitado com SFB. Em ambos os sistemas utilizou-se como critério para definição da velocidade de agitação a mínima velocidade de agitação para suspensão dos microcarregadores+células (N_{JS} , do

inglês *just fully suspended*). Após a etapa de adesão, aumentou-se a agitação para evitar ou minimizar a formação de agregados celulares (para 50 rpm), como descrito na seção Material e Métodos.

Microcarregadores e células foram inoculadas no biorreator de tanque agitado e após 24 horas, foi verificada uma adesão de 75% ($\pm 5,6$). Após esse período observou-se intenso crescimento celular atingindo uma densidade celular máxima de $1,4 (\pm 0,33) \times 10^5$ céls/mL após 4 dias ($\mu_{\max} = 1,1 \text{ d}^{-1}$ ($r^2 = 0,96$)). Tal produção celular – 115 milhões de células – representou um fator de expansão de 7,5 ($\pm 1,2$). Se considerada a quantidade de células inoculadas, o fator de expansão seria de 5,7 ($\pm 1,3$). (Figura 39).

Figura 39 - Perfil de crescimento e viabilidade das MCUs **(A)** e fator de expansão **(B)** em 6 dias de cultivo no biorreator tanque agitado, com inóculo inicial de $2,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio de cultura StemPRO® MSC SFM, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

De acordo com a coloração por DAPI e imagens de MEV, observou-se uma gradual colonização dos microcarregadores pelas células com o passar do tempo (Figura 40).

Figura 40 – Microscopia ótica com coloração DAPI (A, B e C) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (D, E e F) (150x) das MCUs aderidas no microcarregador Cultispher-S durante o cultivo em biorreator tanque agitado em meio StemPRO® MSC SFM nos dias 1, 4 e 6.

Em relação ao metabolismo celular, observou-se que a concentração de glicose não decresceu abaixo de 4,3 mM enquanto a concentração de lactato atingiu um valor máximo de 2,9 mM (Figura 41A). A taxa específica de consumo e produção de glicose e lactato foi elevada durante o início da cultura (dias 1-3) e decresceu durante o tempo (Figura 41B). O rendimento aparente de lactato a partir da glicose ($Y_{lac/glic}$) estimado foi de 1,0 ($\pm 0,43$) durante todo cultivo.

Figura 41 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de ácido láctico e **(B)** taxa específica de consumo de glicose/produção de lactato durante os cultivos das MCUs em biorreator de tanque agitado com inóculo inicial de $2,5 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio de cultura StemPRO[®] MSC SFM, a 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.4.1.3 Caracterização biológica pós-cultivo

No final dos experimentos em frasco *spinner* e em biorreator de tanque agitado, após a digestão enzimática dos microcarregadores, as células foram recuperadas e caracterizadas em relação ao perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação. Além disso, foi realizada análise das propriedades imunomodulatórias através do ensaio de inibição da proliferação de linfócitos.

A análise imunofenotípica demonstrou baixa expressão e ausência de marcadores endoteliais (CD31), moléculas coestimulatórias (CD80) e antígenos HLA-DR em ambos os sistemas. MCUs expressaram elevados níveis (>90%) dos marcadores CD90 e CD73 pré e pós-cultivo, sem diferenças significativas. Porém, observou-se um decréscimo na expressão do marcador CD105 pós-expansão em frasco *spinner* (45% (± 25)) e biorreator (55% ($\pm 7,5$)) (Figura 42).

Figura 42 - Perfil imunofenotípico pré e pós-expansão das MCUs no frasco *spinner* (A) e no biorreator de tanque agitado (B). Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 e 4 doadores diferentes para o biorreator de tanque agitado e frasco *spinner*, respectivamente. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

O potencial de diferenciação também foi analisado através da indução da diferenciação em multi-linhagens. A diferenciação em adipócitos foi caracterizada pela formação de gotículas de gordura (coloração Sudan II-escarlate (Figura 43A), de osteócitos pelo acúmulo dos cristais de oxalato de cálcio (coloração Von Kossa) (Figura 43B) e diferenciação condrogênica pela presença de proteoglicanos através da coloração azul de alciano (Figura 43C).

Figura 43 - Diferenciação das MCUs pós-cultivo em frasco *spinner* e biorreator de tanque agitado observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (A), 28 dias para osteócitos (B) e 14 dias para condrócitos (C).

A inibição da proliferação de linfócitos-T é um ensaio funcional *in vitro* para verificar as propriedades imunomodulatórias exercidas pelas CMMs. Para isso, MCUs foram co-cultivadas com PBMCs marcadas com CFSE e ativadas com ativadores Dynabeads por 5 dias. As diferentes razões de MCUs/linfócitos (1:5, 1:10, 1:50) testadas mostraram que MCUs pré e pós-biorreator foram igualmente capazes de inibir a proliferação de linfócitos-T em diferentes proporções (Figura 44), demonstrando que o grau de inibição da proliferação de células T é diretamente proporcional à quantidade de MCUs na co-cultura.

Figura 44 - Potencial das MCUs de inibição da proliferação de linfócitos-T *in vitro* antes (barra preta) e após (barra cinza) a expansão no biorreator de tanque agitado em condições livres de SFB. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 doadores diferentes. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.4.2 Expansão das MCUs em condições livres de xenoantígenos

Como não foi possível o estabelecimento de um processo totalmente isento de xenoantígenos utilizando formulações de meio de cultura comerciais, avaliou-se então a utilização do soro AB humano para suplementação do meio de cultivo juntamente com o microcarregador de plástico P-102L. Como mencionado na introdução, o soro AB humano representa uma alternativa viável e eficiente para expansão de CMMs com a vantagem de ser produzido *in house*, minimizando os custos e problemas associados ao uso do SFB.

Experimentos prévios em frasco *spinner* foram realizados para padronização de parâmetros como: regime de agitação na fase de adesão, densidade do inóculo inicial, tempo de cultivo, estratégias para maximizar a recuperação celular final, visando o estabelecimento de um processo de expansão efetivo com elevada produção celular. Os melhores resultados foram obtidos com 5g/L de microcarregador de plástico P102L, inóculo de $1,1 \times 10^4$ células/cm², 72 horas de agitação intermitente durante a fase de adesão, recuperação celular utilizando uma associação de Tryple 10x com 2mg/mL de Colagenase IA sob agitação por 7 minutos (artigo em redação).

Como descrito no procedimento experimental, um passo de pré-adesão celular foi realizado em frasco *spinner* com as condições previamente estabelecidas para posterior inoculação no biorreator de tanque agitado. Assim, após 72 horas de cultivo em frasco *spinner*, células+microcarregadores foram transferidas para o biorreator de tanque agitado na concentração de $1,2 (\pm 0,1) \times 10^4$ células/mL. As células apresentaram um elevado crescimento celular, atingindo $9,0 (\pm 1,1) \times 10^4$ células/mL no dia 6, fator de expansão de $7,6 (\pm 1,5)$ e $\mu_{\max} = 0,49 \text{ d}^{-1}$ ($r^2 = 0,99$) (Figura 45).

Figura 45 - Perfil de crescimento das MCUs **(A)** e fator de expansão **(B)** em 7 dias de cultivo no biorreator tanque agitado, com inóculo inicial de $1,2 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α - MEM suplementado com 10% de soro AB humano, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

As MCUs apresentaram baixo consumo de glicose e produção de lactato, não sendo considerados limitantes para o crescimento celular (Figura 46A). Observou-se que a taxa específica de consumo/produção de glicose/lactato foi elevada durante o início da cultura (dias 1-3) (Figura 46 B). O rendimento aparente de lactato a partir da glicose obtido foi de $Y_{lac/gli} = 1,07 (\pm 0,31)$ mol lac/mol gli.

Figura 46 - (A) Perfil de consumo de glicose e produção de ácido láctico e **(B)** taxa específica de consumo de glicose/produção de lactato durante os cultivos das MCUs em biorreator de tanque agitado com inóculo inicial de $1,2 \times 10^4$ células/mL, volume de trabalho de 800 mL, meio α - MEM suplementado com 10% de soro AB humano, 37°C. Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 cultivos de MCUs (três diferentes doadores). As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.4.2.1 Caracterização biológica pós-cultivo

As células foram recuperadas com uma eficiência de 54% ($\pm 15,2$) e após o experimento não apresentaram mudanças em relação à expressão dos marcadores de superfície comparando-se com células pré-cultivo, exceto pelo CD 105 após a expansão ($36,4 \pm 6,8$). Além disso, as células foram capazes de se diferenciar nas três linhagens (adipócitos, osteócitos e condrócitos) e mantiveram seu potencial de inibir a proliferação de linfócitos T (Figura 47).

(A)

(B)

(C)

Figura 47 - Perfil imunofenotípico (A), potencial das MCUs de inibição da proliferação de linfócitos-T *in vitro* (B) pré e pós-expansão no biorreator de tanque agitado em condição livre de xenoantígenos; (C) Diferenciação das MCUs pós-cultivo em frasco biorreator de tanque agitado observado após indução em meios específicos por 21 dias para adipócitos (a), 28 dias para osteócitos (b) e 14 dias para condrócitos (c). Os resultados apresentados são referentes ao valor médio de 3 doadores diferentes. As barras verticais representam o respectivo desvio padrão.

4.5 Análise do secretoma das CMMs

4.5.1 Perfil proteômico global das CMMs provenientes de cultivos estáticos

Para obtenção de um perfil global das proteínas secretadas pelas MCUs, foram realizados cultivos estáticos (frascos T) (n=3, três doadores diferentes) para geração de sobrenadantes enriquecidos com proteínas. Então, realizou-se a quantificação de proteínas totais no sobrenadante da cultura pelo método de Bradford e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10 - Quantificação de proteínas pelo método de Bradford nos sobrenadantes de cultura das células MCUs (3 doadores) em frascos estáticos utilizando o meio α -MEM + 10%SFB.

	Volume total (μ L)	Concentração (μ g/ μ L)	Massa total (μ g)
Doador #1	100	1,21	121,3
Doador #2	100	2,49	248,7
Doador #3	100	1,35	134,7

Assim, 30 μ g de proteínas de cada amostra (em duplicata) foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE para separação e caracterização das proteínas presentes (Figura 48). Observou-se uma similaridade no padrão de bandas entre as CMMs provenientes dos três doadores diferentes, como era esperado. A partir desse gel, cada raia foi seccionada em seis fragmentos de 1cm cada para aumentar a amostragem de íons (peptídeos) detectados pelo espectrômetro de massas permitindo, assim, a identificação também de proteínas de baixa abundância.

Figura 48 - Eletroforese SDS-PAGE do sobrenadante dos cultivos dos três diferentes doadores (duplicata) em frascos estáticos. Ilustração dos fragmentos do gel gerados após o seccionamento de cada amostra em seis partes iguais (1-6).

Cada amostra obtida pela fragmentação do gel SDS-PAGE (6 fragmentos de cada doador em duplicata) foi analisada independentemente por LC-MS/MS. Após a coleta dos dados, realizou-se o processamento e interpretação dos espectros obtidos utilizando-se a plataforma instalada no laboratório de proteômica do câncer do prof. Dr. Vitor Marcel Faça (LabkeyServer). No total, através da análise por LC-MS/MS, aproximadamente 2400 proteínas foram identificadas no secretoma das CMMs (Apêndice C, CD).

Através do software Funrich foi possível observar que a maior parte das proteínas secretadas e identificadas se localiza no citoplasma (19,8%), acompanhado por exossomos e lisossomos (Figura 49).

Figura 49 - Análise do secretoma global das CMMs em relação ao componente celular através do software Funrich.

Para explorar de forma mais aprofundada os resultados obtidos, realizou-se a clusterização das proteínas secretadas entre os três diferentes doadores (duplicata) com base na abundância relativa (Figura 50).

Figura 50 – Representação gráfica do resultado de contagem espectral das proteínas secretadas pelas CMMs utilizando três diferentes doadores (em duplicata) analisados por espectrometria de massas. O software utilizado para essa análise foi o MeV (*MultiExperiment Viewer*). A cor da escala ilustra a relativa expressão das proteínas indicadas de acordo com os doadores: azul denota baixa expressão e vermelho, elevada expressão.

Analisando a clusterização realizada, observa-se um padrão similar em relação à quantidade absoluta de proteínas secretadas entre os doadores. Além disso, o padrão de secreção entre as replicatas foi bem similar, aumentando a confiabilidade das análises. Assim, com base no critério de contagem espectral, dividiu-se as proteínas secretadas em 3 grupos: I) proteínas de maior abundância ($\log 2 = 8-11$), II) abundância intermediária ($\log 2 = 4-8$) e III) baixa abundância ($\log 2 = 0-4$).

As proteínas de maior abundância se referem principalmente às proteínas da matriz extracelular incluindo COL1A2 e COL3A1 (colágeno tipo α -1 e 2), FN (fibronectina), LUM (*lumican*), VCAN (*versican*), BGN (*biglycan*), DCN (*decorin*), FBLN1 (*fibrillin-1*), SPARC (Figura 51). Tais proteínas estão envolvidas principalmente em mecanismos de interação célula-célula, célula-substrato de adesão, recebendo e emitindo sinais que controlam e orquestram a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Gattazo *et al.*, 2014). De fato, de acordo com a Figura 52 observa-se que 54,4% das proteínas estão relacionadas ao processo de crescimento e manutenção celular. Também envolvidas nos processos dinâmicos de produção e degradação da matriz extracelular, as metaloproteinases (MMPs) e inibidores de metaloproteinases (TIMPs) foram identificadas com elevada abundância.

Figura 51 - Análise das proteínas secretadas pelas CMMs com elevada abundância em relação ao componente celular através do software Funrich.

Figura 52 - Análise das proteínas secretadas pelas CMMs com elevada abundância em relação ao envolvimento com processos biológicos através do software Funrich.

Dentre as proteínas de abundância intermediária destacam-se as quimiocinas e os fatores de crescimento. As principais quimiocinas identificadas foram: CCL2 (*Monocyte chemotactic protein-1*), CCL6 (*Small-inducible cytokine A6*), CCL8 (*Monocyte chemoattractant protein 2 (MCP-2)*), CXCL2 (*Macrophage inflammatory protein 2a (MIP2a)*), CXCL5 (*ENA-78*), CXCL6 (*Granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2)*) e CXCL12 (*Stromal cell-derived factor 1 (SDF1)*). As quimiocinas possuem um papel importante nas atividades imunomodulatórias *in vivo* através da mediação de interações entre CMMs e outros tipos celulares imunocompetentes (Kyurkchiev *et al.*, 2014). Os fatores de crescimento detectados foram: IGF-1 e 2 (*Insulin-like growth factor*) e IGFBP -2, -3, -4, -5, -6, -7 (*Insulin-like growth factor-binding protein*).

Interessante mencionar que o TGF- β 1 (*Transforming growth factor 1*) e seu indutor (TGF- β I) também foram identificados com uma abundância intermediária, sendo citados frequentemente com propriedades funcionais das CMMs. Além de outras funções, possui atividade anti-inflamatória, é considerado um dos responsáveis pela transição epitélio-mesenquimial (EMT) e possui capacidade de inibição *in vitro* de células-T (Faça *et al.*, 2012).

Proteínas de baixa abundância incluem ICAM (*intercellular adhesion molecule 1*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), FGF (*fibroblast growth*

factor), PDGF (*platelet-derived growth factor*), KGF (*keratinocyte growth factor*), Ang-1 (*angiopoietin-1*) e as IL-6 e -8 (interleucinas).

Sabe-se que algumas condições de cultivo, como sistemas dinâmicos, podem modular, influenciar e impactar no comportamento das CMMs e seu secretoma (Teixeira *et al.*, 2015). Dessa forma, realizou-se a tentativa de monitorar (técnica de MRM – monitoramento de reações múltiplas) o perfil de secreção de proteínas relevantes no meio de cultura condicionado coletado nos experimentos em biorreator de tanque agitado. Ainda não foi possível a conclusão desse estudo devido a alguns problemas de funcionamento do espectrômetro de massas. Em um futuro próximo, com a conclusão desses experimentos será possível determinar padrões de secreção dessas proteínas com potencial terapêutico durante o tempo de cultura (experimentos *time course*).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Esse projeto foi proposto com o objetivo de explorar duas importantes aplicações das CMMs: células como produto terapêutico e como biofábrica de biomoléculas (secretoma) relevantes visando futura aplicação na terapia celular. Essas diferentes abordagens são justificadas pela crescente necessidade de produção de CMMs em larga escala com qualidade terapêutica e viabilidade econômica, e pela carência de dados proteômicos das CMMs na busca de alvos terapêuticos (proteínas) relevantes que evidenciem seu efeito parácrino.

Nesse trabalho, utilizou-se CMMs derivadas da matriz do cordão umbilical por ser uma fonte atrativa de células. A matriz do cordão umbilical (MCUs) representa uma fonte ilimitada (material descartado após o nascimento da criança), não causa risco ao doador e não necessita de uma metodologia invasiva para sua obtenção. Além disso, MCUs tem demonstrado maior capacidade proliferativa, menor imunogenicidade e menores alterações genômicas devido à idade e doenças referentes aos doadores quando comparado com CMMs provenientes de fontes adultas, sob as mesmas condições (Giorgetti *et al.*, 2009). Apesar das vantagens acima mencionadas e assim como ocorre nas demais fontes, o número de CMMs isoladas de um único cordão umbilical é limitado e a expansão *in vitro* é essencial para atingir o número de células necessárias para uma aplicação terapêutica (10^7 - 10^9 células) (Chen *et al.*, 2004; Le Blanc *et al.*, 2008; Connick *et al.*, 2011). Dessa forma, buscam-se sistemas de cultivo que permitam a produção de CMMs de maneira eficiente, segura, reprodutível e principalmente com menor custo efetivo.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como um dos objetivos principais o estabelecimento de um processo de expansão de CMMs derivadas do cordão umbilical (MCUs), baseado em biorreatores, que possibilite a produção de células funcionais de maneira escalonável e com viabilidade econômica para atender à crescente demanda clínica.

Para isto, a expansão das MCUs foi avaliada no sistema de cultivo mais utilizado pelas empresas da área de terapia celular, os frascos multicamadas

(MC) e em diferentes tipos de biorreatores: tanque agitado (Celligen 310), leito fixo (FibraStage[®]) e fibra-oca (Quantum[®] Cell Expansion System). Uma vez que cada sistema de cultivo possui características específicas, o crescimento, o metabolismo celular, a capacidade de recuperação de células funcionais bem como a viabilidade prática e econômica de cada um deles foi considerada. Com isso, foi possível selecionar o sistema mais adequado para a produção de CMMs considerando uma futura escala comercial.

A duração de cada cultivo variou de acordo com a tecnologia de modo a otimizar a taxa de recuperação celular. O racional foi estender o experimento o máximo possível para maximizar a expansão celular evitando, no entanto, confluência elevada e formação de aglomerados de célula-célula, célula-matriz que prejudicam a recuperação celular. O biorreator de fibras-ocas e o frasco multicamadas não permitem amostragem diária de células, tornando inviável o conhecimento do perfil de crescimento durante o cultivo. Nos frascos multicamadas, a proliferação celular (confluência) foi monitorada através da visualização em microscópio ótico. De acordo com nossos resultados, partindo da mesma densidade celular inicial (5000 células/cm²), um mesmo nível de expansão celular foi observada para o biorreator de tanque agitado, leito fixo e frascos multicamadas (Tabela 8). No biorreator de fibras-ocas utilizou-se 1/5 do inóculo inicial utilizado nos outros sistemas. Assim, para uma melhor comparação, estimou-se o fator de expansão para cada sistema e os resultados obtidos mostraram que o biorreator de fibras-ocas apresentou o maior fator de expansão ($9,8 \pm 1,0$), acompanhado pelo biorreator de tanque agitado, frascos multicamadas e biorreator de leito fixo ($8,8 \pm 0,39$, $8,7 \pm 0,90$, $6,9 \pm 1,3$).

Embora muitos estudos foquem na utilização de tecnologias escalonáveis, automatizadas e em concordância com as normas BPM, cultivos em frascos planares e multicamadas são comumente usados para produzir quantidades elevadas de CMMs para estudos clínicos. De acordo com Schirmaier e colegas (2014), uma quantidade de $2,5 \times 10^8$ - 1×10^9 células pode ser atingida utilizando frascos multicamadas (cellSTACKs[®]) de 10-40 andares. No entanto, a manutenção da qualidade celular, o monitoramento do processo e escalonamento são difíceis ou impossíveis de se assegurar (Schirmaier *et al.*,

2014). Além disso, a falta de controle dos parâmetros de cultura em cultivos planares (pH, oxigênio dissolvido, temperatura) pode afetar a consistência e segurança do produto celular (Dos Santos *et al.*, 2014).

Não foram encontrados trabalhos na literatura reportando a expansão das CMMs em biorreator de leito fixo. No entanto, CMMs derivadas da placenta (denominadas PLacental eXpanded – PLX) estão sendo produzidas em larga-escala pela empresa Pluristem Therapeutics (Israel) utilizando um biorreator de leito fixo e Fibra-Cel como suporte para ancoramento das células (o mesmo utilizado nesse trabalho). As células expandidas nesse sistema já estão sendo utilizadas como produto terapêutico em diversos ensaios clínicos com resultados promissores. Além disso, todo o processo de manufatura e controle dos produtos é realizado em conformidade com padrões de qualidade internacionais (aprovado pelo FDA, PMDA, agências regulatórias da Alemanha, Coréia do Sul e Israel) (www.pluristem.com).

Os fatores de expansão obtidos neste trabalho para o biorreator de tanque agitado são maiores que os encontrados na literatura, compreendidos na faixa de 5-6 (Rafiq *et al.*, 2013; Kehoe *et al.*, 2012). Utilizando um biorreator de 5L (volume de trabalho de 2,5 L), microcarregador não-poroso plástico P-102L (Solohill Engineering Inc., USA) e CMMs da medula óssea, Rafiq e colaboradores (2013) obtiveram uma densidade máxima de células de $1,7 \times 10^5$ células/mL em 12 dias de cultivo, com um fator de expansão de 6 vezes. Em um trabalho semelhante, Jing e colaboradores (2013) mostraram a expansão de CMMs humanas da medula óssea utilizando um biorreator do tipo tanque agitado descartável de 3L (Mobius CellReady) e após 12 dias, foi produzido um total de $2,0 \times 10^5$ células/mL (Jing *et al.*, 2013). Apenas um trabalho descrevendo a expansão de células derivadas do cordão umbilical (MCUs) em biorreator de tanque agitado (1,5L) utilizando microcarregador Cytodex-1 foi reportado. Porém, os autores não deixam clara a densidade celular máxima obtida (Hupfeld *et al.*, 2014). Pela análise da literatura, se torna evidente que ainda há escassez de estudos avaliando a expansão de MCUs em biorreator de tanque agitado. Nossos resultados mostraram a obtenção de elevadas densidades celulares ($6,6 \times 10^5$ células/mL) quando comparados com outros estudos publicados na literatura.

Este é o primeiro relato sobre a expansão de MCUs em biorreator de fibras-ocas. A utilização deste biorreator para expansão de células destinadas à terapia celular tem como vantagens principais: automatização, redução da necessidade de mão de obra e operação em sistema fechado, tornando-o adequado para bioprocessos em conformidade com as diretrizes de BPM (Jones *et al.*, 2013). O número total de células obtido em nosso estudo ($2\text{--}3 \times 10^8$ células) foi semelhante ao obtido no estudo publicado utilizando o mesmo biorreator de fibras-ocas (Quantum Expansion system) após 21 dias de cultivo com amostras de medula óssea não-processadas (Hanley *et al.*, 2014). No entanto, o presente estudo mostra a produção de um grande número de células em um curto período de tempo (5 dias), representando uma maior produtividade e menores custos.

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada para os biorreatores de tanque agitado e leito fixo por apresentarem dados de número de células em função do tempo. Observou-se que as MCUs cresceram de forma mais rápida no biorreator de tanque agitado ($\mu_{\text{máx}} = 0,70 \text{ d}^{-1}$) que no biorreator leito fixo ($\mu_{\text{máx}} = 0,21 \text{ d}^{-1}$). Valores similares de velocidade específica de crescimento máxima foram obtidos em trabalhos presentes na literatura: $\mu_{\text{máx}} = 0,34 \text{ d}^{-1}$ para CMMs humanas de medula óssea em biorreator de tanque agitado de 5L (Rafiq *et al.*, 2013); $\mu_{\text{máx}} = 0,48 \text{ d}^{-1}$ para CMMs de cabra expandidas em frasco *spinner* com o microcarregador Cytodex 1 (Schop *et al.*, 2008); $\mu_{\text{máx}} = 0,31 \text{ d}^{-1}$ para CMMs humanas expandidas em frasco *spinner* com o microcarregador Cultispher-S (Eibes *et al.*, 2010).

Diferentemente dos processos de produção de proteínas recombinantes em que a proteína é o produto e, portanto, danos celulares durante o cultivo podem ocorrer sem prejuízo da produção, na terapia celular, as células são o produto terapêutico final. Por este motivo, as células expandidas *ex vivo* tem de ser eficientemente recuperadas do sistema de cultivo mantendo as características funcionais e o potencial terapêutico. Para isso, é necessário estabelecer estratégias de recuperação celular, especialmente para expansão de CMMs em larga escala para garantir que o bioprocessos seja viável (Nienow, 2014). Tendo isto em consideração, a eficácia da recuperação celular (%) nos diferentes sistemas de cultivo foi avaliada. A recuperação celular demonstrou

ser um desafio ainda maior no biorreator de leito fixo. Mesmo com a utilização da enzima Tryple[®] mais concentrada (10x), no final do cultivo foi possível apenas a recuperação de 18% ($\pm 0,77$) das células expandidas. Em experimentos preliminares, estabeleceu-se um tempo máximo de 30 minutos de ação da enzima Tryple 10x sem perda significativa da viabilidade, e ainda assim, utilizando esse tempo e dois ciclos de tratamento enzimático, observou-se que a maioria das células permaneceu aderida aos discos de Fibra-Cel. Esta baixa recuperação de células pode ser atribuída ao movimento suave da plataforma que impediu a difusão da enzima de maneira eficiente ao longo do frasco.

O biorreator de tanque agitado apresentou uma porcentagem de recuperação celular de 61% ($\pm 15,7$). O microcarregador Cultispher S utilizado nesse cultivo apresenta vantagens no processo de recuperação celular devido à sua degradação por digestão enzimática, permitindo a liberação das células-livres na solução. Porém, observou-se uma intensa formação de aglomerado de microcarregadores e células, dificultando uma eficiente recuperação celular. Tal aglomeração tem sido frequentemente descrita na literatura (Eibes *et al.*, 2010; Ferrari *et al.*, 2012) e atribuída ao fato de que as CMMs não cessam o crescimento com a confluência, continuando a crescer em multicamadas, provavelmente, em função da excessiva produção de matriz extracelular pelas próprias células (Ferrari *et al.*, 2012). Sistemas de cultivo sob agitação promovem a formação de agregados porque os microcarregadores colidem com frequência e a matriz extracelular atua como um material adesivo conectando os microcarregadores. Com isso, surgem alguns problemas de morte celular e dificuldades na recuperação e quantificação celular, pois as células que ficam presas no interior dos aglomerados não recebem oxigenação e nutrientes de forma adequada. Além disso, as células não interagem completamente com os reagentes utilizados no método de quantificação celular, gerando resultados que podem estar subestimados. A recuperação celular para o biorreator tanque agitado obtida neste trabalho (61% ($\pm 15,7$)) foi levemente inferior às reportadas para a expansão de CMMs em pequena escala (70-95% de recuperação celular) (Weber *et al.*, 2007; Goh *et al.*, 2013; Caruso *et al.*, 2014). Porém, mesmo considerando a taxa de recuperação

celular obtida, o nível de produção celular atingida nesse trabalho foi maior que os reportados na literatura (aproximadamente 4×10^5 células/mL).

Vale ressaltar que a maioria dos estudos não descreve a eficiência da recuperação celular (%), principalmente os que reportam a expansão de CMMs em larga escala (Rafiq *et al.*, 2013), dificultando uma melhor comparação dos resultados. Em um estudo recente, Nienow e colaboradores (2014) relataram um método eficiente para recuperação celular de CMMs (biorreator de tanque agitado com microcarregadores), sob agitação intensa e utilização de uma enzima apropriada (0,25% (v/v) tripsina e 0,02% (v/v) de EDTA), atingindo uma elevada taxa de recuperação (95%).

No biorreator de fibras-ocas, assumiu-se 100% de recuperação celular, uma vez que no segundo ciclo de tripsinização não houve aumento significativo no número de células, indicando que a grande maioria das células foi recuperada já no primeiro ciclo. Dados fornecidos pela empresa Terumo BCT (ainda não publicados) em cultivos envolvendo distintas células (inclusive CMMs) mostraram elevada recuperação celular (95% dos cultivos com recuperação celular de 90-100%), corroborando com nossos dados. Uma vez que a quantificação diária de células e a visualização da confluência não é possível neste biorreator, um controle estático (frasco T) com a mesma densidade celular inicial foi realizada em paralelo para inferir o crescimento celular. Então, quando o controle estático atingiu 80-90% de confluência celular, finalizou-se o experimento. Esta estratégia foi eficiente para evitar confluência excessiva e recuperar células livres sem aglomeração. Nos frascos multicamadas, a mesma suposição foi feita. Após 80-90% de confluência (dia 6), as células foram tripsinizadas e quantificadas. Uma observação visual ao microscópio óptico foi realizada após a tripsinização, evidenciando que nenhuma célula permaneceu aderida ao frasco (100% de eficiência na recuperação celular).

O conhecimento do metabolismo das células em cultura é essencial para obtenção de altas densidades celulares e garantir a correta funcionalidade das mesmas. O consumo dos substratos glicose e glutamina, bem como a produção dos subprodutos, ácido lático e amônia, foram acompanhados durante todos os cultivos para caracterizar o metabolismo celular e assegurar

um ambiente com adequada qualidade nutricional para o crescimento das células. Em função das trocas de 50% do meio de cultura nos frascos multicamadas (realizada no dia 3), biorreatores de tanque agitado e de leito fixo (diárias a partir dos dias 4 e 5, respectivamente) e o modo de operação em perfusão no biorreator de fibras-ocas, não houve exaustão dos nutrientes glicose e glutamina em nenhum dos experimentos realizados. Apesar da glutamina ser o segundo componente principal dos meios de cultura empregados para o cultivo de células de mamíferos, a mesma não parece ser um substrato limitante para o cultivo das CMMs, fato evidenciado pelo baixo consumo desse substrato em todos os cultivos. Lactato e amônia foram produzidos em virtude do consumo de glicose e glutamina, respectivamente. As concentrações inibitórias para CMMs humanas são relatadas como sendo 28 mM para lactato e 3 mM para amônia, e estes valores não foram observados nos experimentos (Schop *et al.*, 2008). Além disso, o aumento excessivo de lactato no meio de cultura pode causar uma diminuição significativa do pH. Esse fato também não foi observado nos cultivos devido às trocas de meio de cultura realizadas e ao constante monitoramento e controle no biorreator de tanque agitado (valores tabelados no Apêndice A e B, CD).

Quocientes metabólicos fornecem uma maneira eficiente para caracterizar padrões de metabolismo celular em termos de consumo e taxas de produção por células viáveis. Tais parâmetros foram calculados apenas para os biorreatores de leito fixo e tanque agitado pela disponibilidade de dados diários da concentração celular. Os consumos específicos de glicose (q_{gli}) e glutamina (q_{gln}) foram maiores no biorreator tanque agitado em relação ao biorreator leito fixo e, conseqüentemente, as produções específicas de lactato (q_{lact}) e amônia (q_{amo}) também foram maiores. O $Y_{lact/gli}$ fornece uma estimativa da fração de glicose convertido em lactato através da glicólise. O valor de $Y_{lact/gli} = 1,09 \pm 0,020 \text{ mol}_{lac} / \text{mol}_{gli}$ para o biorreator de leito fixo e $1,45 \pm 1,79 \text{ mol}_{lac} / \text{mol}_{gli}$ para o biorreator de tanque agitado foram menores do que o máximo teórico ($2,0 \text{ mol}_{lac} / \text{mol}_{gli}$) e também menores do que os relatados em cultivos com microcarregadores ($Y_{lact/gli} = 1,88 \pm 0,07 \text{ mol}_{lac} / \text{mol}_{gli}$ (Eibes *et al.*, 2010); $Y_{lact/gli} = 1,6 \text{ mol}_{lac} / \text{mol}_{gli}$ (Fernandes *et al.*, 2007)). Isto indica que as células foram capazes de metabolizar a glicose através da eficiente via de fosforilação

oxidativa (ao invés da via glicolítica anaeróbica), sugerindo um metabolismo energético mais eficiente.

A viabilidade econômica da expansão das MCUs nos sistemas de cultivo estudados neste trabalho também foi avaliada. Para esta análise foi considerado como cenário a utilização de MCUs para o tratamento da DECH após o transplante de CTH (ensaio clínico fase I/II em andamento no Hemocentro de Ribeirão Preto). Dados experimentais obtidos nos diferentes sistemas de cultivo como taxa de proliferação, eficiência na recuperação celular, fator de expansão e viabilidade celular foram utilizados na ferramenta de economia de bioprocessos desenvolvida. Como o biorreator de leito-fixado apresentou a pior eficiência na recuperação celular, foi estimado que é necessário um maior número de doadores de cordão umbilical e consequentemente, o estabelecimento de um maior banco de células para atingir a demanda de 10 000 pacientes anuais, resultando em um maior custo por dose nessa etapa. Os frascos multicamadas e o biorreator de fibra-oca apresentaram o menor custo por dose para estabelecimento do banco de células, pois exibiram elevada taxa de recuperação celular e, portanto, menor número de doadores. Apesar do biorreator de fibra-oca apresentar ótimos resultados em termos de expansão e recuperação celular, o elevado consumo de reagentes, consumíveis (custos/cm²) e elevado custo do equipamento o tornou o mais dispendioso, com altíssima estimativa de custo por dose (US\$ 65.143). Os frascos multicamadas foram considerados como a tecnologia mais robusta e com menor custo-efetivo no cenário específico avaliado, acompanhado pelo biorreator de tanque agitado, o que contradiz alguns estudos de análise de custos de bioprocessos envolvendo CMMs. Simaria e colaboradores (2013) realizaram uma análise econômica detalhada para expansão de CMMs e desenvolveram uma ferramenta capaz de prever quais sistemas de cultivos apresentariam o menor custo-efetivo no cenário da indústria considerando dose *versus* demanda. Segundo os autores, o biorreator de tanque agitado com microcarregadores é a única opção economicamente viável quando a demanda é elevada (10 000 bilhões de células/lote). Essa diferença observada entre a análise de viabilidade econômica reportada por Simaria e colaboradores (2014) e a análise econômica realizada com os dados

experimentais do presente trabalho pode ser atribuída ao delineamento do estudo de caso, que envolve fatores como dose, demanda e quantidade de lotes estabelecidos, bem como diferenças nas condições experimentais (densidade máxima de células obtidas, eficiência na recuperação celular, entre outros). Nossos resultados revelaram ainda que a viabilidade econômica dos diferentes sistemas de cultivo é altamente dependente do cenário de reembolso selecionado, sendo que há cenários comerciais relevantes em que nenhum sistema irá satisfazer uma estratégia de negócios satisfatória (margem bruta de 85%), indicando que estudos ainda precisam ser realizados visando estabelecer um processo de manufatura eficiente e economicamente viável.

Como o biorreator de tanque agitado foi eleito o melhor sistema de cultivo considerando os parâmetros avaliados neste trabalho (performance experimental, custos, escalonabilidade, adequação com normas BPM), e visando atender as exigências de qualidade e regulatórias, avaliou-se então a expansão das MCUs em condições livres de SFB e xenoantígenos neste sistema de cultivo.

Isso decorreu do fato de que terapias utilizando CMMs são atualmente consideradas *Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMPs), devendo, portanto, ser manufaturadas em condições de BPM (Torre *et al.*, 2015). Processos isentos de derivados animais e xenoantígenos atendem estas normas de BPM. Como dito anteriormente, os experimentos em condições isentas de SFB foram realizados em conjunto com o grupo de pesquisa *Stem Cell Bioengineering & Regenerative Medicine Laboratory* do prof. Dr. Joaquim Cabral e da Prof. Dra. Claudia Lobato. Trabalhos realizados pelo grupo demonstraram uma eficiente expansão de CMMs da medula óssea e tecido adiposo em frasco *spinner* (Santos *et al.*, 2011; Carmelo *et al.*, 2015) e biorreator de tanque agitado (Dos Santos *et al.*, 2014) utilizando microcarregador de plástico e o meio de cultura comercial livre de xenoantígenos Stempro MSC. No entanto, conforme mostrado no item 4.4.1, esse protocolo estabelecido se mostrou ineficiente para expansão das MCUs. Assim, explorou-se a utilização do microcarregador Cultispher S, que tinha sido utilizado com sucesso na primeira etapa deste trabalho. As diferenças observadas em termos de crescimento das MCUs utilizando microcarregador

de plástico e o Cultispher S usando o mesmo meio de cultura comercial pode indicar a influência da matriz do microcarregador no comportamento celular. A topografia e composição química do substrato podem induzir respostas celulares *in vitro*, incluindo proliferação, adesão e sobrevivência das células (Fu *et al.*, 2011). De fato, Her e colaboradores demonstraram que a proliferação de CMMs da medula óssea sofria variação de acordo com a rigidez do substrato: alta taxa proliferativa em substratos menos rígidos (Her *et al.*, 2013). Esta evidência poderia justificar a dificuldade na expansão das MCUs quando utilizamos microcarregador de plástico (rígido) comparado com o Cultispher S (microcarregador de colágeno). Além disso, a macroporosidade do Cultispher S pode potencialmente fornecer proteção mecânica em condições agitadas, minimizando a morte/dano celular gerada pela tensão de cisalhamento comum em cultivos sob agitação.

Os experimentos iniciais em microcarregador Cultispher S foram realizados em frasco *spinner* e após uma fase lag de 48 horas, atingiu-se uma densidade celular máxima de $2,4 (\pm 1,1) \times 10^5$ céls/mL após 5 dias, correspondendo a uma fator de expansão de $5,3 (\pm 1,6)$ ($n=4$, quatro doadores diferentes). Essa condição foi então implementada no biorreator de tanque agitado. Sob uma condição de adesão com agitação constante e volume de trabalho de 800 mL, a eficiência de adesão celular nos microcarregadores foi um pouco menor ($75 (\pm 5,6\%)$) da obtida em frasco *spinner* ($90 (\pm 0,23\%)$). No dia 4 de cultivo obteve-se uma densidade celular máxima de $(1,4 (\pm 0,33) \times 10^5$ céls/mL) ($\mu_{\max} = 1,1 \text{ d}^{-1}$), valor também inferior ao obtido em frasco *spinner* ($2,4 (\pm 1,1) \times 10^5$ céls/mL). Apesar da menor densidade de células, essa condição de cultivo permitiu a produção de uma grande quantidade de células em um pequeno período de tempo (4 dias), ao invés de 7-10 dias descritos na literatura para sistemas agitados (Caruso *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2014; Zhao, G. *et al.*, 2015), o que pode significar um processo de expansão com maior produtividade e menor custo.

A dificuldade observada neste trabalho em desenvolver uma plataforma totalmente livre de xenoantígenos utilizando MCUs e o meio de cultura comercial Stempro MSC em cultivos agitados com microcarregadores, sendo que muitos estudos demonstram essa capacidade com CMMs de outras fontes

de origem humana (Dos Santos *et al.*, 2014; Santhagunam *et al.*, 2014; Carmelo *et al.*, 2015; Heathman *et al.*, 2015), pode estar relacionada com as características biológicas intrínsecas das células derivadas do cordão umbilical em combinação com múltiplas variáveis de um bioprocessamento (propriedades do suporte de ancoramento: geometria, topografia, rigidez, carga, composição do substrato; meio de cultura: composição, volume de trabalho, impacto do fluido; sistema de cultivo: agitação, distribuição da tensão de cisalhamento) (Ma, 2016). Tan e colaboradores (2015) afirmaram em seus estudos que um meio de cultura isento de xenoantígenos capaz de proporcionar o crescimento satisfatório de células em monocamada (cultivo estático), pode não ser satisfatório para cultivos dinâmicos, sendo necessário, portanto algumas modificações das condições (por exemplo, adição de suplementos específicos e/ou moléculas adesivas) (Tan *et al.*, 2015).

Frente à dificuldade em implementar um cultivo totalmente livre de xenoantígenos com o meio comercial, optou-se por testar a utilização do soro AB humano como suplemento para o meio de cultivo tradicional. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que o mesmo pode ser utilizado de maneira segura e eficiente para expansão de CMMs de diversas fontes tanto em monocamada (frascos T) (de Lima Prata, 2011; Santos, 2015; Santos *et al.*, 2016 submetido) quanto em frascos *spinner* (artigo em redação). Assim, realizou-se o escalonamento das condições previamente estabelecidas em frascos *spinner* para o biorreator de tanque agitado, obtendo uma eficiente expansão, $9,0 (\pm 1,1) \times 10^4$ células/mL no dia 6, representando um fator de expansão de 7,6 ($\pm 1,5$). Até o momento não há artigos descritos na literatura envolvendo a expansão de MCUs em biorreator de tanque agitado em condições livres de xenoantígenos. Esses resultados representam um grande avanço na produção de CMMs em larga escala em condições compatíveis com a produção de um produto mais seguro e eficiente, sem riscos de reações alergênicas/imunogênicas e transmissão de agentes patogênicos ao paciente.

Para comparação dos resultados de expansão celular obtidos no biorreator de tanque agitado utilizando-se diversas condições e meios de cultivo, calculou-se a produtividade celular (cél/mL/dia). Os resultados obtidos foram: $9,4 (\pm 0,42) \times 10^4$ células/mL/dia, $1,5 (\pm 0,18) \times 10^4$ células/mL/dia e $3,5$

($\pm 0,82$) $\times 10^4$ células/mL/dia, utilizando-se o meio de cultivo suplementado com SFB/microcarregador Cultispher S, soro AB humano/microcarregador de plástico P102L e meio comercial Stempro MSC/microcarregador Cultispher S, respectivamente. Observou-se uma redução significativa na produtividade celular quando utilizou-se condições livres de SFB e xenoantígenos em comparação com o meio de cultivo suplementado com SFB. Apesar dos experimentos não serem comparáveis devido as diferentes condições experimentais utilizadas, pode-se realizar algumas suposições acerca dessas diferenças observadas. Um dos principais fatores é a composição do meio de cultura. Embora muitas formulações isentas de xenoantígenos sejam delineadas para as CMMs (como é o caso do Stempro MSC utilizado nesse trabalho), alguns estudos reportam a necessidade de suplementação do meio de cultivo com fatores de crescimento e hormônios para obtenção de um crescimento celular satisfatório (Chase *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2015). A adição de PDGF, bFGF e TGF- β 1 no meio de cultivo Stempro MSC resultou em uma melhora no crescimento de CMMs da medula óssea (condições estáticas) em um estudo publicado por Chase e colaboradores (Chase *et al.*, 2010). Tal fato é mais pronunciado quando ocorre a transição de um cultivo em monocamada para sistemas agitados com microcarregadores. Isso porque nesses sistemas as células estão expostas a um microambiente totalmente distinto, com intensa turbulência do fluido (tensão de cisalhamento) culminando com diferentes padrões de adesão e proliferação celular (Tan *et al.*, 2015). Além disso, é amplamente conhecido que o SFB possui fatores de proteção, evitando a morte celular devido à intensa agitação; reforçando o fato de que meios de cultura isentos de xenonantígenos devem ser suplementados nesses sistemas. Outra variável importante a ser considerada quando da utilização de meios de cultura isentos de xenoantígenos é a necessidade de realização de um pré-revestimento do microcarregador com uma matriz adesiva (Rajaraman *et al.*, 2013). A ausência do pré-revestimento no microcarregador de plástico em condições livres de xenoantígenos pode ter sido o motivo principal pela baixa produtividade celular observada.

Além do acima exposto, os resultados obtidos nas diferentes condições utilizadas no biorreator tanque agitado demonstraram que de fato, não existe

um protocolo otimizado e genérico para produção de células em larga escala mesmo considerando a mesma fonte de CMMs. O mesmo deve ser sempre adaptado para cada tipo de microcarregador, meio de cultura, suplementos e outras condições de cultivo.

Um dos requisitos essenciais no desenvolvimento de um bioprocesso para expansão de CMMs para utilização na terapia celular é a manutenção das características imunofenotípicas e de multipotência pós-cultivo. As células mantiveram a capacidade de diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos em todos os sistemas de cultivo avaliados suplementados ou não com SFB. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão da maioria dos marcadores de superfície antes e após a expansão nos frascos multicamadas e biorreatores na presença de meio de cultivo contendo SFB. Nos cultivos realizados em condições livres de soro e xenoantígenos, foi observada uma diminuição de expressão do marcador CD105 de 94% ($\pm 4,0$) para 55% ($\pm 7,5$) e 91% ($\pm 6,5$) para 36,4 ($\pm 6,8$) no biorreator de tanque agitado utilizando meio de cultura Stempro MSC e soro AB humano, respectivamente. Nos biorreatores de leito fixo e tanque agitado utilizando meio de cultura suplementado com SFB também notou-se um leve decréscimo no marcador CD 105 após o cultivo, porém essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa. Mark e colaboradores também notaram uma redução da expressão do CD105 quando cultivaram CMMs em meio de cultura sem SFB (Mark *et al.*, 2013). Santos e colaboradores (2014) também observaram a mesma diminuição. No entanto, os autores foram capazes de demonstrar que a perda da expressão de CD105 após cultura em sistemas dinâmicos pode ser revertida após cultivo em condições estáticas (Dos Santos *et al.*, 2014). Além disso, as características funcionais das células no presente trabalho (diferenciação e inibição da proliferação de linfócitos-T) não foram afetadas pela redução na expressão de CD105.

Além dos estudos relacionados com o estabelecimento de uma plataforma de produção de CMMs para a terapia celular, o secretoma destas células também foi avaliado a fim de caracterizar e identificar proteínas com potencial terapêutico promissor.

A descoberta de que apenas uma pequena porção de CMMs, quando injetadas local ou sistemicamente, de fato irá se incorporar ao tecido lesado, levaram à conclusão de que o efeito terapêutico benéfico proveniente dessa terapia está diretamente relacionado ao seu efeito parácrino. Essa hipótese abriu novas perspectivas terapêuticas com o objetivo de desenvolver estratégias livres de células baseadas no uso do secretoma das CMMs como uma alternativa segura e potencial no campo da terapia celular (Baglio *et al.*, 2012). Esses efeitos parácrinos ou autócrinos estão relacionados em diversos processos celulares (imunomodulação, quimioatração, apoptose e angiogênese), fazendo com que o conjunto de proteínas secretadas pelas CMMs tenha grande relevância. Para entender melhor os mecanismos subjacentes a estes efeitos, é importante decifrar sistematicamente a composição do secretoma das CMMs e avaliar as ações dos componentes identificados (Salgado e Gimble, 2013). Um grande número de fatores secretados pelas CMMs já foram descritos e reportados. Contudo, tais proteínas foram superficialmente analisadas por métodos como cromatografias, *microarrays*, ELISA tendo um universo imenso de proteínas relevantes a serem melhor exploradas (Faça *et al.*, 2012).

Com a utilização da técnica de espectrometria de massas realizou-se um perfil global do secretoma de CMMs permitindo a identificação de milhares de proteínas interessantes. Como foi observado, as proteínas de maior abundância são provenientes da matriz extracelular (MEC), como o colágeno, fibronectina, *lumican*, *versican*, dentre outras. Essas proteínas contribuem ativamente para montagem e organização da MEC fornecendo um microambiente em que os sinais provenientes da interação célula-MEC estão funcionalmente integrados de modo a permitir a manutenção da homeostase das células-tronco. A proteína SPARC foi secretada em elevados níveis pelas CMMs no nosso trabalho, corroborando com os dados presentes na literatura. SPARC tem a capacidade de se ligar a diversas proteínas residentes da MEC (colágeno, vitronectina, trombospondina) de forma a afetar a expressão de MMPs e alterar o formato celular. Dessa forma, SPARC age para regular a interação das células com o ambiente extracelular em resposta à lesão (Bradshaw e Sage, 2001). Trabalhos também demonstraram que a SPARC

pode modular a função do osteoblasto (Chiellini *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010). A deprivação de SPARC causa osteopenia devido ao decréscimo do número de osteoblastos e osteoclastos, sugerindo que SPARC pode regular o recrutamento ou proliferação de precursores osteoblásticos (Delany *et al.*, 2000).

As MMPs e TIMPs, também identificadas com elevada abundância neste trabalho, participam ativamente na fisiologia celular, tais como comunicação celular, migração e apoptose. O balanço entre a atividade de MMPs e TIMPs está envolvido no remodelamento do tecido, angiogênese e hematopoese. As CMMs dão origem a células maduras via mecanismos parácrinos através da secreção de MEC que regulam a diferenciação celular por sinalização inter- e intracelular. Tais componentes da MEC podem coordenar a ativação/supressão de genes de diferentes MMPs capazes de remodelar a matriz culminando com a migração celular para tecidos específicos ou modulando o enxertamento de células (Mannello, 2006). TIMPs são inibidores naturais das MMPs e possui participação ativa no remodelamento do tecido da MEC (Lambert *et al.*, 2004).

A proteína TGF- β 1 identificada no nosso estudo (abundância intermediária) é considerada uma das mais proeminentes citocinas imunomodulatórias produzidas e secretadas constitutivamente pelas CMMs. TGF- β 1 regula múltiplas funções celulares incluindo proliferação, diferenciação, migração, adesão e apoptose afetando inúmeros processos biológicos como: cicatrização, carcinogênese, angiogênese e resposta imune. A regulação da resposta imune é sua principal atividade, orquestrando a iniciação e resolução da resposta inflamatória, assim como a indução e manutenção da tolerância imune através da proliferação, diferenciação, ativação e sobrevivência dos leucócitos. Essa propriedade pode ser constatada pela inibição da proliferação de células-T pelas CMMs mediada por TGF- β 1 (Kyurkchiev *et al.*, 2014). Nemeth e colaboradores (2010) realizaram um estudo *in vivo* utilizando CMMs da medula óssea em um modelo murino de asma. Observaram um aumento considerável da secreção de TGF- β 1, que foi capaz de suprimir a resposta alérgica, evidenciando sua atividade anti-inflamatória (Nemeth *et al.*, 2010).

Apesar de secretadas com abundância intermediária, diferentes classes da família das quimiocinas foram observadas nesse trabalho. As quimiocinas

são moléculas relativamente pequenas (7,5-12,5 KDa) que participam em processos de inflamação, diferenciação, angiogênese e migração de células imunes. As CMMs secretam quimiocinas como resposta ao estímulo pró-inflamatório com objetivo de atrair e ativar neutrófilos, monócitos, linfócitos, células NK, hematopoéticas, progenitores endoteliais e outras células efetoras para o local da infecção (Kyurkchiev *et al.*, 2014). Ren e colaboradores (2008) demonstraram que as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 produzidas pelas CMMs estimulam a migração de células T, fazendo com que sua capacidade de resposta seja suprimida pelo óxido nítrico (NO). Os resultados obtidos por esses pesquisadores corroboram com diversos estudos demonstrando que as quimiocinas liberadas pelas CMMs exercem predominantemente atividade quimiotática, desempenhando papel direto no processo de imunomodulação (Ren *et al.*, 2008).

Apesar das interleucinas IL-6 e IL-8 terem sido secretadas em baixa abundância, muitos trabalhos as descrevem como as citocinas mais expressas por CMMs de diversas fontes (Liu e Hwang, 2005; Hwang *et al.*, 2009; Blaber *et al.*, 2012). IL-6 é uma citocina multifuncional com importante papel na regulação da resposta imune e no processo de homeostase. Além disso, IL-6 está envolvida no remodelamento do tecido atuando nas células do tecido conectivo, proteases e inibidores de proteases (Liu e Hwang, 2005). Park e colaboradores (2009) avaliaram 120 citocinas secretadas pelas CMMs a nível de RNAm e demonstraram que a IL-6 apresentava a maior expressão dentre todas, permitindo chegar à conclusão que a IL-6 é a citocina responsável pelos efeitos imunoregulatórios das CMMs (Park *et al.*, 2009). Igualmente importante, a IL-8 (CXCL8) foi a primeira quimiocina descrita com propriedades pró-angiogênicas, fato confirmado em diversos tipos de tumores (Hou *et al.*, 2014). Um estudo liderado por Wang (2015) demonstrou claramente que CMMs promoveram o crescimento tumoral (câncer colorretal) aumentando a angiogênese por mecanismos dependentes da secreção da IL-8 em modelo animal. Sugeriram ainda que, o rompimento das interações tumor-estroma e supressão da secreção de IL-8 pelas CMMs pode representar uma abordagem original para o tratamento do câncer colorretal (Wang *et al.*, 2015). Em um estudo semelhante, pesquisadores relataram que a IL-8 pode potencializar a

progressão tumoral através da indução do processo de EMT (Fernando *et al.*, 2011).

Em uma situação de lesão tecidual, moléculas inflamatórias e células imunes juntamente com células endoteliais e fibroblastos modificam o microambiente que culminam com a mobilização e diferenciação de CMMs para reposição do tecido danificado. Nesse cenário, CMMs produzem vários fatores pró-angiogênicos como VEGF, HGF, FGF, KGF que afetam diretamente as células endoteliais. Esses fatores foram observados em nossas análises com baixa abundância e são muito importantes na manutenção da integridade endotelial e promoção da angiogênese através do desenvolvimento de fibroblastos, células endoteliais e células progenitoras dos tecidos, permitindo o reparo e regeneração do tecido (Ma *et al.*, 2014).

No geral, as proteínas secretadas pelas CMMs estão envolvidas em importantes processos biológicos e podem representar uma alternativa promissora à terapia baseada em células. Estudos proteômicos globais das CMMs contribuem significativamente para o entendimento dos processos de regeneração e reparo aos quais as células estão envolvidas e a caracterização dessas proteínas certamente irá expandir as aplicações clínicas das CMMs. Nesse sentido, o meio condicionado proveniente do cultivo de CMMs (secretoma) pode ser considerado como um importante produto terapêutico (terapia livre de células) para diversas doenças. A utilização de biorreatores para esse fim pode ser uma alternativa interessante, pois possui a vantagem das condições de cultivo serem controladas, assegurando a reprodutibilidade dos experimentos. O futuro monitoramento de proteínas nesse sistema de cultivo permitirá identificar os fatores-chave dessa “sopa” regenerativa.

Parekkadan e colaboradores (2007) investigaram o efeito da utilização de meio condicionado de CMMs em modelo de rato com insuficiência hepática fulminante. Administração intravenosa do secretoma de CMMs aumentou a sobrevivência dos ratos através da inibição da invasão dos leucócitos, duplicação do duto biliar e morte hepatocelular. A análise posterior revelou que 30% desse secretoma era composto por quimiocinas (CCL2, CCL22, CXCL9, CXCL11, CXCL6, CCL20) (Parekkadan *et al.*, 2007).

Outro interessante estudo avaliou a função parácrina de CMMs derivadas do tecido adiposo na regeneração de tecidos lesados. As células foram ativadas com TNF- α e o respectivo meio condicionado foi responsável por acelerar a angiogênese, proliferação e infiltração de células imune em modelo de feridas em ratos. Citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8 tiveram papel fundamental no processo de cicatrização (Heo *et al.*, 2011).

A melhora na regeneração do tecido periodontal foi demonstrada por Kawai e colaboradores (2015) utilizando meio condicionado de CMMs da medula óssea em modelo de ratos. Os resultados mostraram que a regeneração do tecido foi promovida por vários processos como: mobilização de CMMs endógena, angiogênese e diferenciação, mediados principalmente por IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) e HGF (*hepatocyte growth factor*) (Kawai *et al.*, 2015).

Recentemente, um primeiro estudo foi publicado utilizando o secretoma de CMMs da medula óssea em humanos para regeneração óssea alveolar em implantes dentários. Oito pacientes foram tratados no estudo. Os resultados revelaram uma formação óssea inicial em todos os casos, sem nenhuma complicação associada. Os autores destacaram a importância das citocinas IGF-1, VEGF, TGF- β 1 e HGF identificadas previamente no processo de regeneração óssea e classificaram a abordagem utilizada como segura e eficiente para ser utilizada na medicina regenerativa óssea (Katagiri *et al.*, 2016).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A avaliação de diferentes sistemas de cultivo para expansão de CMMs levando em consideração fatores como nível de expansão e recuperação, escalonabilidade, qualidade das células produzidas e viabilidade econômica dos processos de expansão é crítica para a exploração comercial das terapias celulares. Nossos resultados mostraram que o melhor biorreator considerando nível de expansão e escalonabilidade pode não ser a melhor escolha quando se avalia os custos associados. MCUs expandidas no biorreator de fibras-ocas apresentaram maior taxa de proliferação celular, fator de expansão e recuperação celular quando comparadas com MCUs expandidas em frascos multicamadas e biorreatores de tanque agitado e leito fixo. No entanto, o biorreator de fibras-ocas foi considerado o mais dispendioso com elevados custos diretos e indiretos. O frasco multicamada mostrou ser o sistema mais robusto e com menor custo no cenário específico avaliado, porém a dificuldade no monitoramento do processo, escalonabilidade e garantia da assepsia o torna inadequado para uma produção em larga escala. O biorreator de tanque agitado foi eleito mais adequado analisando-se performance experimental, custos, escalonabilidade e adequação com normas das agências regulatórias.

Os resultados também revelaram que a viabilidade econômica é dependente do cenário de reembolso avaliado, sendo que há cenários industriais relevantes que nenhum sistema de cultivo irá atingir uma estratégia de negócios satisfatória, indicando que mais estudos precisam ser realizados para estabelecer processos de produção de CMMs otimizados.

Foi também possível neste trabalho estabelecer um processo de expansão de MCUs em biorreator de tanque agitado em condições livres de SFB e xenoantígenos. Apesar dos níveis de expansão terem sido menores que os obtidos utilizando SFB, foi demonstrada a produção de células funcionais e em quantidades clinicamente significativas. Esta etapa representa um passo fundamental para o desenvolvimento de um bioprocessos de produção de CMMs eficiente e seguro, compatível com as exigências das agências regulatórias para produtos baseados em células.

Além disso, constatou-se o papel das CMMs como sendo biofábricas de proteínas relevantes e interessantes do ponto de vista terapêutico, sendo que a futura abordagem de monitoramento das mesmas em biorreatores poderá representar um método seguro e eficaz de produção de produtos terapêuticos livres de células.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Ther**, v. 15, n. 2, p. 109-16, 2008.
- AL-SAQI, S. H. et al. Defined serum-free media for in vitro expansion of adipose-derived mesenchymal stem cells. **Cytotherapy**, v. 16, n. 7, p. 915-26, 2014.
- ALMEIDA-PORADA, G. et al. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Exp Hematol**, v. 30, n. 12, p. 1454-62, 2002.
- ALVAREZ-LLAMAS, G. et al. Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, n. 4, p. 589-600, 2007.
- ARANGO-RODRIGUEZ, M. L. et al. Could cancer and infection be adverse effects of mesenchymal stromal cell therapy? **World J Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 408-17, 2015.
- ARUFE, M. C. et al. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. **Stem Cells Dev**, v. 20, n. 7, p. 1199-212, 2011.
- BADENES, S. M. et al. Scalable Expansion of Human-Induced Pluripotent Stem Cells in Xeno-Free Microcarriers. **Methods Mol Biol**, 2014.
- BAGLIO, S. R.; PEGTEL, D. M.; BALDINI, N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. **Front Physiol**, v. 3, p. 359, 2012.
- BARTON-BURKE, M. et al. Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. **Oncology (Williston Park)**, v. 22, n. 11 Suppl Nurse Ed, p. 31-45, 2008.
- BIEBACK, K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. **Transfus Med Hemother**, v. 40, n. 5, p. 326-35, 2013.
- BIEBACK, K.; KINZEBACH, S.; KARAGIANNI, M. Translating Research into Clinical Scale Manufacturing of Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cells Int**, v. 2010, 2010.
- BLABER, S. P. et al. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. In: (Ed.). **J Transl Med**, v.10, p.172, 2012. .
- BOO, L. et al. Expansion and preservation of multipotentiality of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 5, p. 1343-56, 2011.
- BRADSHAW, A. D.; SAGE, E. H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. **J Clin Invest**, v. 107, n. 9, p. 1049-54, 2001.
- BUTLER, D. L. et al. The use of mesenchymal stem cells in collagen-based scaffolds for tissue-engineered repair of tendons. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 849-863, 2010.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem**, v. 98, n. 5, p. 1076-84, 2006.

- CARMELO, J. G. et al. A xeno-free microcarrier-based stirred culture system for the scalable expansion of human mesenchymal stem/stromal cells isolated from bone marrow and adipose tissue. **Biotechnol J**, v. 10, n. 8, p. 1235-47, 2015.
- CARUSO, S. R. et al. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 4, p. 889-895, 2014.
- CHAN, J. K.; GOTHERSTROM, C. Prenatal transplantation of mesenchymal stem cells to treat osteogenesis imperfecta. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 223, 2014.
- CHANG, J. et al. Optimization of culture of mesenchymal stem cells: a comparison of conventional plate and microcarrier cultures. **Cell Prolif**, v. 45, n. 5, p. 430-7, 2012.
- CHASE, L. G. et al. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. **Stem Cell Res Ther**, v. 1, n. 1, p. 8, 2010.
- CHEN, A. K.; REUVENY, S.; OH, S. K. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 7, p. 1032-46, 2013.
- CHEN, G. et al. Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium. **Cell Tissue Bank**, v. 15, n. 4, p. 513-21, 2014.
- CHEN, S. L. et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**, v. 94, n. 1, p. 92-5, 2004.
- CHEN, X. et al. Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach. **J Proteome Res**, v. 4, n. 2, p. 570-7, 2005.
- CHICO, E.; RODRIGUEZ, G.; FIGUEREDO, A. Biorreatores para células animais. In: MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. Tecnologia do cultivo de células animais. São Paulo: Roca, 2008, p. 216-217.
- CHIELLINI, C. et al. Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. **BMC Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 26, 2008.
- CHOI, Y. A. et al. Secretome analysis of human BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in osteoblast differentiation. **J Proteome Res**, v. 9, n. 6, p. 2946-56, 2010.
- CIAVARELLA, S. et al. Mesenchymal stem cells: a new promise in anticancer therapy. **Stem Cells Dev**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2011.
- CICCOCIOPPO, R. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. **Gut**, v. 60, n. 6, p. 788-98, 2011.
- COLTER, D. C.; SEKIYA, I.; PROCKOP, D. J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 14, p. 7841-5, 2001.

- CONNICK, P. et al. The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. **Trials**, v. 12, p. 62, 2011.
- COVAS, D. T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 9, p. 1179-83, 2003.
- DE BARI, C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum**, v. 44, n. 8, p. 1928-42, 2001.
- DE LA FUENTE, A. et al. Proteome analysis during chondrocyte differentiation in a new chondrogenesis model using human umbilical cord stroma mesenchymal stem cells. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 2, p. M111.010496, 2012.
- DELANY, A. M. et al. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. **J Clin Invest**, v. 105, n. 7, p. 915-23, 2000.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.
- DOS SANTOS, F. et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 1116-1127, 2014.
- EIBES, G. et al. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. **J Biotechnol**, v. 146, n. 4, p. 194-7, 2010.
- ESTRADA, R. et al. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. **J Cell Physiol**, v. 219, n. 3, p. 563-71, 2009.
- FAÇA, V. M. Human mesenchymal stromal cell proteomics: contribution for identification of new markers and targets for medicine intervention. **Expert Rev Proteomics**, v. 9, n. 2, p. 217-30, 2012.
- FERNANDES, A. M. et al. Mouse embryonic stem cell expansion in a microcarrier-based stirred culture system. **J Biotechnol**, v. 132, n. 2, p. 227-36, 2007.
- _____. Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 6, p. 515-22, 2009.
- FERNANDES-PLATZGUMMER, A. et al. Scale-up of mouse embryonic stem cell expansion in stirred bioreactors. **Biotechnol Prog**, v. 27, n. 5, p. 1421-32, 2011.
- FERNANDO, R. I. et al. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. **Cancer Res**, v. 71, n. 15, p. 5296-306, 2011.
- FERRARI, C. et al. Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. **Biotechnol Prog**, v. 28, n. 3, p. 780-7, 2012.
- FRAUENSCHUH, S. et al. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. **Biotechnol Prog**, v. 23, n. 1, p. 187-93, 2007.

- FRIIS, T. et al. Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina. **Scand Cardiovasc J**, v. 45, n. 3, p. 161-8, 2011.
- FU, R. H. et al. Differentiation of stem cells: strategies for modifying surface biomaterials. **Cell Transplant**, v. 20, n. 1, p. 37-47, 2011.
- GARVICAN, E. R. et al. Mesenchymal stem cells modulate release of matrix proteins from tendon surfaces in vitro: a potential beneficial therapeutic effect. **Regen Med**, v. 9, n. 3, p. 295-308, 2014.
- GATTAZO, F.; URCIUOLO, A.; BONALDO, P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche ☆. v. 1840, n. 8, p. 2506–2519, 2014.
- GIORGETTI, A. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. In: (Ed.). **Cell Stem Cell**. United States, v.5, 2009. p.353-7.
- GODARA, P.; MCFARLAND, C. D.; NORDON, R. E. Design of bioreactors for mesenchymalstem cell tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 408–420, 2008.
- GOEDECKE, A. et al. Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 5, n. 8, p. 648-54, 2011.
- GOH, T. K. et al. Microcarrier culture for efficient expansion and osteogenic differentiation of human fetal mesenchymal stem cells. **Biores Open Access**, v. 2, n. 2, p. 84-97, 2013.
- GOTTIPAMULA, S. et al. Isolation, expansion and characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. **Cell Tissue Res**, v. 356, n. 1, p. 123-35, 2014.
- _____. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. **J Tissue Eng Regen Med**, 2013.
- GUILLOT, P. V. et al. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1717-25, 2008.
- HANLEY, P. J. et al. Efficient manufacturing of therapeutic mesenchymal stromal cells with the use of the Quantum Cell Expansion System. **Cytotherapy**, v. 16, n. 8, p. 1048-58, 2014.
- HARTMANN, I. et al. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. **J Immunol Methods**, v. 363, n. 1, p. 80-9, 2010.
- HASSAN, S. et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: downstream processing decisions. **Regen Med**, v. 10, n. 5, p. 591-609, 2015.
- HATLAPATKA, T. et al. Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 17, n. 4, p. 485-93, 2011.

- HEATHMAN, T. R. et al. Serum-free process development: improving the yield and consistency of human mesenchymal stromal cell production. **Cytotherapy**, v. 17, n. 11, p. 1524-35, 2015.
- HEMEDA, H.; GIEBEL, B.; WAGNER, W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 170-80, 2014.
- HEO, S. C. et al. Tumor necrosis factor-alpha-activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. **J Invest Dermatol**, v. 131, n. 7, p. 1559-67, 2011.
- HER, G. J. et al. Control of three-dimensional substrate stiffness to manipulate mesenchymal stem cell fate toward neuronal or glial lineages. **Acta Biomater**, v. 9, n. 2, p. 5170-80, 2013.
- HERVY, M. et al. Long term expansion of bone marrow-derived hMSCs on novel synthetic microcarriers in xeno-free, defined conditions. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92120, 2014.
- HOCH, A. I.; LEACH, J. K. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. **Stem Cells Transl Med**, v. 3, n. 5, p. 643-52, 2014.
- HOGAN, M. V. et al. Tissue engineering solutions for tendon repair. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 19, n. 3, p. 134-42, 2011.
- HOOGDUIJN, M. J. et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 12, p. 1496-500, 2010.
- HOU, Y. et al. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. **Cell Biol Int**, v. 38, n. 9, p. 1050-9, 2014.
- HSIEH, J. Y. et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72604, 2013.
- HUPFELD, J. et al. Modulation of mesenchymal stromal cell characteristics by microcarrier culture in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 11, p. 2290-2302, 2014.
- HWANG, J. H. et al. Comparison of Cytokine Expression in Mesenchymal Stem Cells from Human Placenta, Cord Blood, and Bone Marrow. **J Korean Med Sci**, v. 24, n. 4, p. 547-54, 2009.
- IKEBE, C.; SUZUKI, K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 951512, 2014.
- JENKINS, M. J.; FARID, S. S. Human pluripotent stem cell-derived products: advances towards robust, scalable and cost-effective manufacturing strategies. **Biotechnol J**, v. 10, n. 1, p. 83-95, 2015.
- JIANG, R. et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. **Front Med**, v. 5, n. 1, p. 94-100, 2011.

- JING, D. et al. Growth Kinetics of Human Mesenchymal Stem Cells in a 3-L Single-Use, Stirred-Tank Bioreactor. **BioPharm International**, v.26, n.4, 2013.
- JOCHEMS, C. E. et al. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? **Altern Lab Anim**, v. 30, n. 2, p. 219-27, 2002.
- JONES, M. et al. Genetic stability of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in the Quantum System. **Cytotherapy**, v. 15, n. 11, p. 1323-39, 2013.
- JULAVIJITPHONG, S. et al. A xeno-free culture method that enhances Wharton's jelly mesenchymal stromal cell culture efficiency over traditional animal serum-supplemented cultures. **Cytotherapy**, v. 16, n. 5, p. 683-91, 2014.
- JUNG, S. et al. Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 59, n. 2, p. 106-20, 2012.
- KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 95, n. 5, p. 209-14, 2004.
- KATAGIRI, W. et al. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. **Head Face Med**, v. 12, p. 5, 2016.
- KATSUBE, Y. et al. Restoration of cellular function of mesenchymal stem cells from a hypophosphatasia patient. **Gene Ther**, v. 17, n. 4, p. 494-502, 2010.
- KAWAI, T. et al. Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration. **Cytotherapy**, v. 17, n. 4, p. 369-81, 2015.
- KEHOE, D. et al. Scale-up of Human Mesenchymal Stem Cells on Microcarriers in Suspension in a Single-use Bioreactor. **BioPharm International**, 2012.
- KIM, H. S. et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. **J Proteome Res**, v. 11, n. 2, p. 839-49, 2012.
- KIM, J. M. et al. Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 1, p. 216-24, 2013.
- KOCHAE, A. et al. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Stem Cells**, v. 25, n. 5, p. 1270-8, 2007.
- KUPCOVA SKALNIKOVA, H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2196-211, 2013.
- KYURKCHIEV, D. et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. **World J Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 552-570, 2014.
- LAMBERT, E. et al. TIMPs as multifacial proteins. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 49, n. 3, p. 187-98, 2004.
- LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579-86, 2008.

- _____. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet**, v. 363, n. 9419, p. 1439-41, 2004.
- LEE, M. J. et al. Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha-induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **J Proteome Res**, v. 9, n. 4, p. 1754-62, 2010.
- LI, F.; WANG, X.; NIYIBIZI, C. Bone marrow stromal cells contribute to bone formation following infusion into femoral cavities of a mouse model of osteogenesis imperfecta. **Bone**, v. 47, n. 3, p. 546-55, 2010.
- LIU, C. H.; HWANG, S. M. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. In: (Ed.). **Cytokine**. United States, v.32, p.270-9, 2005.
- MA, S. et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death Differ**, v. 21, n. 2, p. 216-25, 2014.
- MA, T. Biomanufacturing of human mesenchymal stem cells in cell therapy: Influence of microenvironment on scalable expansion in bioreactors. v. 108, p. 44–50, 2016.
- MABED, M.; SHAHIN, M. Mesenchymal stem cell-based therapy for the treatment of type 1 diabetes mellitus. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 7, n. 3, p. 179-90, 2012.
- MANNELLO, F. Multipotent mesenchymal stromal cell recruitment, migration, and differentiation: what have matrix metalloproteinases got to do with it? **Stem Cells**, v. 24, n. 8, p. 1904-7, 2006.
- MARK, P. et al. Human Mesenchymal Stem Cells Display Reduced Expression of CD105 after Culture in Serum-Free Medium. **Stem Cells Int**, v. 2013, p. 698076, 2013.
- MARTIN, I.; WENDT, D.; HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends Biotechnol**, v. 22, n. 2, p. 80-6, 2004.
- MATHIASSEN, A. B. et al. Rationale and design of the first randomized, double-blind, placebo-controlled trial of intramyocardial injection of autologous bone-marrow derived Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure (MSC-HF Trial). **Am Heart J**, v. 164, n. 3, p. 285-91, 2012.
- MAUMUS, M.; JORGENSEN, C.; NOEL, D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2229-34, 2013.
- MEIRELLES LDA, S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 5-6, p. 419-27, 2009.
- MINDAYE, S. T. et al. Global proteomic signature of undifferentiated human bone marrow stromal cells: evidence for donor-to-donor proteome heterogeneity. **Stem Cell Res**, v. 11, n. 2, p. 793-805, 2013.
- MIRANDA, H. C. et al. A quantitative proteomic and transcriptomic comparison of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord vein. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2607-17, 2012.

- NEMETH, K. et al. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 12, p. 5652-7, 2010.
- NIENOW, A. W. A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. v. 85, p. 79–88, 2014.
- NOLD, P. et al. Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 430, n. 1, p. 325-30, 2013.
- NONNIS, S. Effect of fetal bovine serum in culture media on MS analysis of mesenchymal stromal cells secretome. v. 10, p. 28–30, 2015.
- OSKOWITZ, A. et al. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. **Stem Cell Res**, v. 6, n. 3, p. 215-25, 2011.
- OTSURU, S. et al. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. **Blood**, v. 120, n. 9, p. 1933-41, 2012.
- PAREKKADAN, B. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS One**, v. 2, n. 9, p. e941, 2007.
- PARK, C. W. et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. **Int J Stem Cells**, v. 2, n. 1, p. 59-68, 2009.
- PENG, L. et al. Comparison of biological characteristics of marrow mesenchymal stem cells in hepatitis B patients and normal adults. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 11, p. 1743-6, 2007.
- PHILLIPS, B. W. et al. Attachment and growth of human embryonic stem cells on microcarriers. **J Biotechnol**, v. 138, n. 1-2, p. 24-32, 2008.
- PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, 1999.
- POLTAVTSEVA, R. A. et al. Mesenchymal stem cells from human dental pulp: isolation, characteristics, and potencies of targeted differentiation. **Bull Exp Biol Med**, v. 158, n. 1, p. 164-9, 2014.
- PORADA, C. D.; ALMEIDA-PORADA, G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 12, p. 1156-66, 2010.
- PRATA, Karen de Lima. Análise comparativa das células mesenquimais obtidas de diferentes tecidos dos anexos fetais. 2011. 164 p. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.
- RAFIQ, Q. A. et al. Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. **Biotechnol Lett**, v. 35, n. 8, p. 1233-45, 2013.
- RAJARAMAN, G. et al. Optimization and scale-up culture of human endometrial multipotent mesenchymal stromal cells: potential for clinical application. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 19, n. 1, p. 80-92, 2013.

- RAMDASS, B.; KOKA, P. S. Ligament and Tendon Repair through Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 84-8, 2014.
- REHMAN, J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292-8, 2004.
- REN, G. et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 2, p. 141-50, 2008.
- RINGDEN, O.; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 24, n. 1, p. 65-72, 2011.
- ROBERTS, I. et al. Scale-up of human embryonic stem cell culture using a hollow fibre bioreactor. **Biotechnol Lett**, v. 34, n. 12, p. 2307-15, 2012.
- ROCHA, B. et al. Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. **J Proteome Res**, v. 13, n. 2, p. 1045-54, 2014.
- ROCHE, S. et al. Comparative proteomic analysis of human mesenchymal and embryonic stem cells: towards the definition of a mesenchymal stem cell proteomic signature. **Proteomics**, v. 9, n. 2, p. 223-32, 2009.
- SAHOO, S.; TOH, S. L.; GOH, J. C. A bFGF-releasing silk/PLGA-based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesenchymal progenitor cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 11, p. 2990-8, 2010.
- SALGADO, A. J.; GIMBLE, J. M. Secretome of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2195, 2013.
- SANTHAGUNAM, A. et al. Isolation and ex vivo expansion of synovial mesenchymal stromal cells for cartilage repair. **Cytotherapy**, v. 16, n. 4, p. 440-53, 2014.
- SANTOS, F. et al. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 17, n. 12, p. 1201-10, 2011.
- SANTOS, Vanessa Tieko Marques. Desenvolvimento de metodologia para produção de soro AB humano para suplementação de meio de cultura destinado ao cultivo de células mesenquimais. 2015. 83 p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- SCHOP, D. et al. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 2, n. 2-3, p. 126-35, 2008.
- _____. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 4, n. 2, p. 131-40, 2010.
- SEEBACH, C. et al. Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. **Calcif Tissue Int**, v. 80, n. 4, p. 294-300, 2007.

- SHIM, W. S. et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 324, n. 2, p. 481-8, 2004.
- SIMARIA, A. S. et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: single-use cell expansion technologies. **Biotechnol Bioeng**, v. 111, n. 1, p. 69-83, 2014.
- SIMOES, I. N. et al. Human mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: successful isolation and ex vivo expansion using serum-/xeno-free culture media. **Biotechnol J**, v. 8, n. 4, p. 448-58, 2013.
- SPEES, J. L. et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. **Mol Ther**, v. 9, n. 5, p. 747-56, 2004.
- SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. **Cell Transplant**, 2015.
- STASTNA, M.; VAN EYK, J. E. Investigating the secretome: lessons about the cells that comprise the heart. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 5, n. 1, p. o8-o18, 2012.
- STENDERUP, K. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, n. 6, p. 919-26, 2003.
- SWAMYNATHAN, P. et al. Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. **Stem Cell Res Ther**, v. 5, n. 4, p. 88, 2014.
- SYED, B. A.; EVANS, J. B. Stem cell therapy market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 3, p. 185-186, 2013.
- SZCZYPKA, M. et al. Single-Use Bioreactors and Microcarriers - BioProcess International. 2014.
- TADOKORO, M. et al. New bone formation by allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in a patient with perinatal hypophosphatasia. **J Pediatr**, v. 154, n. 6, p. 924-30, 2009.
- TAN, K. Y. et al. Serum-free media formulations are cell line-specific and require optimization for microcarrier culture. **Cytotherapy**, v. 17, n. 8, p. 1152-65, 2015.
- TEIXEIRA, F. G. et al. Do hypoxia/normoxia culturing conditions change the neuroregulatory profile of Wharton Jelly mesenchymal stem cell secretome? **Stem Cell Res Ther**, v. 6, p. 133, 2015.
- TIMMINS, N. E. et al. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 7, p. 1817-26, 2012.
- TORRE, M. L. et al. Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 6, p. 677-85, 2015.
- VAES, B. et al. Quality Control During Manufacture of a Stem Cell Therapeutic. **BioProcess International**, v.10, n.3, p. 50-55, 2012.

- VAN DEN BOS, C. et al. Therapeutic human cells: manufacture for cell therapy/regenerative medicine. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 138, p. 61-97, 2014.
- WALPOLE, S. C. et al. The weight of nations: an estimation of adult human biomass. **BMC Public Health**, v. 12, p. 439, 2012.
- WANG, D. et al. The bioreactor: a powerful tool for large-scale culture of animal cells. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 6, n. 5, p. 397-403, 2005.
- WANG, J. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 40, p. 42825-37, 2015.
- WEBER, C. et al. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. **Open Biomed Eng J**, v. 1, p. 38-46, 2007.
- WINGARD, J. R. et al. Predictors of death from chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1428-35, 1989.
- XU, W. et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 229, n. 7, p. 623-31, 2004.
- YANG, Y.; ROSSI, F. M.; PUTNINS, E. E. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. **Biomaterials**, v. 28, n. 20, p. 3110-20, 2007.
- YOUNG, H. E. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anat Rec**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.
- YU, Y. et al. Ex vitro expansion of human placenta-derived mesenchymal stem cells in stirred bioreactor. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 159, n. 1, p. 110-8, 2009.
- ZAGO, M.A. Terapia Celular, Transplante de células, de Tecidos ou de Órgãos. In: ZAGO, M.A.; COVAS D.T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, 2007, p.110.
- ZHAO, G. et al. Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 38, 2015.
- ZHAO, K. et al. Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 21, n. 1, p. 97-104, 2015.
- ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-28, 2001.
- ZVONIC, S. et al. Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, n. 1, p. 18-28, 2007.